

Aus der
Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson

Untersuchungen zur Wirkung extrakorporaler
Stoßwellen auf den Gelenkknorpel -
In vivo Untersuchungen am Tiermodell der Ratte

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Judith Ernst
aus Leimen

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Maier

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Gustav Schelling

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christian G. Chaussy
Priv. Doz. Dr. Wolfgang Böcker

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Susanne Mayer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2009

Inhalt

1. Einleitung.....	1
2. Grundlagen.....	3
2.1. Gelenkknorpel und traumatische Knorpelveränderungen	3
2.1.1. Aufbau und Funktion des Gelenkknorpels.....	3
2.1.2. Traumatische Knorpelveränderungen	6
2.2. Grundlagen der Stoßwellentherapie.....	10
2.2.1. Historische Entwicklung der Stoßwellentherapie.....	10
2.2.2. Biophysikalische Grundlagen extrakorporaler Stoßwellen	11
2.2.3. Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf biologische Gewebe	17
2.2.4. Klinische Anwendung extrakorporaler Stoßwellen	20
2.2.5. Nebenwirkungen der extrakorporalen Stoßwellentherapie.....	20
3. Material und Methoden.....	22
3.1. Tiermodell	22
3.1.1. Tierhaltung	22
3.1.2. Gruppeneinteilung.....	22
3.1.3. Anästhesie der Versuchstiere	23
3.1.4. Durchführung der Kontaktradiografie	23
3.1.5. Durchführung der Stoßwelle.....	23
3.1.6. Präparation der Hüftköpfe	23
3.2. Histologie und Immunhistochemie.....	23
3.2.1. Entparaffinierung der histologischen Schnitte	23
3.2.2. HE-Färbung.....	23
3.2.3. Safranin-O/Fast Green Färbung.....	23
3.2.4. Auswertung der histologischen Präparate.....	23
3.2.5. Immunhistochemie	23
3.2.6. Auswertung der Immunhistochemie	23
4. Ergebnisse	23
4.1. Stoßwellenbehandlung.....	23
4.2. Kontaktradiografie	23
4.3. Histologie	23
4.4. Immunhistochemie	23

5.	Diskussion	23
5.1.	Diskussion der Methodik	23
5.2.	Diskussion der Ergebnisse	23
6.	Zusammenfassung	23
7.	Literatur	23
8.	Danksagung	23

1. Einleitung

Die extrakorporale Stoßwellentherapie wird seit Mitte der 1990'er Jahre vor allem in Europa, Asien und USA zur Behandlung orthopädischer Krankheitsbilder angewandt (Rompe und Wirth 2002). Das ursprünglich aus der Urologie stammende Behandlungsverfahren (Chaussy et al. 1982) wurde zunächst in Pilotstudien für die Therapie von Pseudarthrosen eingesetzt, wobei man sich das osteoneogenetische Potential der Stoßwellen zunutze machte (Valchanou and Michailov 1991). Aufgrund der berichteten klinischen Erfolge stiegen die Behandlungszahlen rapide an, obwohl zum damaligen Zeitpunkt keine kontrollierten Studien mit standardisiertem Behandlungsprotokoll vorlagen. Im weiteren Verlauf wurde der Einsatz der Stoßwellentherapie auf die Behandlung der Tendinosis calcarea der Schulter unter anderem mit dem Ziel der Zertrümmerung des Kalkdepots in der Rotatorenmanschette erweitert (Gerdesmeyer et al. 2003; Maier et al. 2000b). Schmerztherapeutische Indikationen der Stoßwellentherapie stellen chronische Verläufe der Epicondylitis humeri radialis (Maier et al. 2000a; Maier et al. 2001) und der plantaren Fasziitis (Maier et al. 2000a; Maier et al. 2000c) dar.

Zusammen mit dem zunehmenden klinischen Einsatz extrakorporaler Stoßwellen wurde deren Wirkung auf biologische Gewebe von zahlreichen Arbeitsgruppen untersucht. Vor allem die durch Stoßwellen hervorgerufene Osteoneogenese (Delius et al. 1995; Ikeda et al. 1999; Maier et al. 2004) und die schmerzlindernde Wirkung (Ohtori et al. 2001) standen im Mittelpunkt bisheriger Untersuchungen. Die genauen molekularen Wirkmechanismen konnten nur ansatzweise geklärt werden (Maier et al. 2002; Maier et al. 2003; Takahashi et al. 2003).

Über die Wirkung von Stoßwellen auf Gelenkknorpel ist nur sehr wenig bekannt (Vaterlein et al. 2000). Gelenkknorpel liegt jedoch häufig im Behandlungsgebiet bei der extrakorporalen Stoßwellentherapie am Patienten, wie beispielsweise bei der Behandlung der Tendinosis calcarea am Schultergelenk (Gerdesmeyer et al. 2003; Maier et al. 2000b). In der Literatur sind zwei Fälle beschrieben, bei denen nach extrakorporaler Stoßwellenbehandlung an der Schulter eine Nekrose des Humeruskopfes auftrat (Durst et al. 2002; Liu et al. 2006). Als mögliche Mechanismen, die dabei zur Schädigung des Humeruskopfes führen, wurden eine direkte Zellschädigung durch stoßwelleninduzierte Kavitation (Gerdesmeyer et al. 2002) oder die

Ruptur kleiner Blutgefäße (Zhong et al. 2001) diskutiert. Diese bereits bekannten Nebenwirkungen extrakorporaler Stoßwellen könnten ebenfalls zu einer Traumatisierung des Gelenkknorpels führen.

Traumatische Schäden des Gelenkknorpels können degenerative Umbauvorgänge des Gelenkknorpels verursachen. In der Literatur sind verschiedene Tiermodelle bekannt, bei denen durch chirurgische Traumatisierung des Gelenks eine Knorpel-degeneration induziert wird. Ein solches Modell stellt das Hüftgelenk der Ratte dar (Elliott et al. 2006), das in der vorliegenden Arbeit gewählt wurde, um eine mögliche Traumatisierung des Gelenkknorpels durch Stoßwellen zu untersuchen. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde somit die folgende Hypothese überprüft:

Stoßwellen einer Energieflussdichte von $0,5 \text{ mJ/mm}^2$ führen zur Veränderung der molekularen Zusammensetzung des hyalinen Gelenkknorpels am Hüftgelenk der Ratte.

2. Grundlagen

2.1. Gelenkknorpel und traumatische Knorpelveränderungen

2.1.1. Aufbau und Funktion des Gelenkknorpels

Synoviale Gelenke stellen ein Organsystem dar, das aus artikulierenden, mit hyalinem Knorpel überzogenen Gelenkflächen, dem angrenzenden (subchondralen) Knochengewebe und der die Gelenkhöhle umhüllenden – mit Synovialmembran ausgekleideten Kapsel – besteht. Die von der Synovialmembran gebildete Synovialflüssigkeit besitzt neben einer mechanischen Funktion (Reibungsreduktion) auch eine wichtige Ernährungsfunktion für den Gelenkknorpel (Aigner und Soder 2006).

Knorpel gehört zu den Binde- und Stützgeweben. Es werden drei Arten von Knorpel unterschieden: hyaliner, elastischer und Faserknorpel. Hyaliner Knorpel kommt vor allem als Gelenkknorpel vor und zeichnet sich durch seine spezielle Struktur aus. Diese macht ihn besonders stabil gegenüber Druck- und Scherkräften und bietet eine reibungs- und abriebsfreie Oberfläche zum optimalen Gleiten der Gelenke. Makroskopisch ist der hyaline Gelenkknorpel ein weitgehend glatter, durch die Synovialflüssigkeit spiegelnd-glänzender, weißlich bis gelblicher Gelenküberzug (Aigner und Soder 2006).

Gelenkknorpel besteht aus extrazellulärer Matrix und zellulären Bestandteilen, den Chondrozyten [vgl. Tabelle 2.1]. Der Anteil der Chondrozyten an der organischen Gesamtmasse entspricht 1-10% und nimmt mit zunehmendem Alter ab. Die von den Chondrozyten gebildete extrazelluläre Matrix setzt sich zu 60-80% aus Wasser, zu 15-20% aus Kollagen (vorwiegend Typ-II Kollagen, geringe Anteile von Typ-V, -VI, -IX, -X, -XI Kollagen) und zu 3-10% aus Proteoglykanen (hauptsächlich Aggrecan) zusammen (Anteile jeweils am Nassgewicht) (Poole 1986).

Die besonderen biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels entstehen durch die komplexe Anordnung der Kollagenfibrillen und Proteoglykane. Proteoglykane sind Makromoleküle, die aus einem Kernprotein und angelagerten Glykosaminoglykanketten bestehen. An Glykosaminoglykanen sind im Knorpel unter anderem Chondroitinsulfat 4-6 und Keratansulfat zu finden. Die Proteoglykane wiederum werden über sogenannte Linkproteine an große Hyaluronatmoleküle gebunden. Die

Wasserbindungskapazität der Proteoglykane ist für die Stoßdämpfung verantwortlich, während das Kollagennetzwerk für die Reißfestigkeit und damit die strukturelle Integrität des Knorpels ursächlich ist. Neben ihrer biomechanischen Funktion ist die Knorpelmatrix auch für die Gewebemöostase bedeutend, weil sie die Reaktionsmuster der Chondrozyten über Zell-Matrix-Wechselwirkungen wesentlich mitbestimmt (Bruckner and van der Rest 1994).

Tabelle 2.1: Bestandteile der extrazellulären Matrix des hyalinen Knorpels

Komponente	% des Nassgewichts
Wasser	60-80%
Kollagen Typ-II	15-20%
Aggrecan (Proteoglykan)	3-10%
Weitere Bestandteile:	
- Proteoglykane (Biglycan, Decorin, Fibromodulin)	zusammen < 5%
- Kollagene (Typ-V, -VI, -IX, -X, -XI)	
- Link Protein	
- Anchorin	
- Hyaluronate	
- Fibronectin	
- Lipide	

Der Gelenkknorpel lässt sich in drei Zonen unterteilen [vgl. Abbildung 2.1] (Rudert und Wirth 1998):

- Die oberflächliche Zone (10-20% der Knorpeldicke) zeichnet sich durch parallel zur Oberfläche angeordnete, relativ dünne Kollagenfibrillen und spindelförmige Chondrozyten aus, die eine hohe Zugfestigkeit ermöglichen (Kempson et al. 1973). Die extrazelluläre Matrix in diesem Bereich besteht vor allem aus Kollagen und nur zu einem sehr geringen Anteil aus Proteoglykanen. Die Wasserkonzentration ist in dieser Schicht am höchsten (80%).
- Die mittlere Zone des Knorpels macht 40-60% seiner Dicke aus. Hier ist die Konzentration an Proteoglykanen besonders hoch und die an Wasser am ge-

ringsten (65%). Die Chondrozyten sind ovalär bis rundlich und perpendicular zur Oberfläche in Säulen angeordnet.

- In der tiefen Zone (30% der Knorpeldicke) sind die Knorpelzellen rund und ebenfalls in Säulen angeordnet. Die Kollagenfasern sind senkrecht ausgerichtet und tauchen in die sogenannte „Tidemark“ ein. Sie ist die Grenze zwischen nicht-kalzifiziertem (obere drei Zonen) und kalzifiziertem Knorpel.
- Den Übergang zum Knochen bildet die Zone des kalzifizierten Knorpels, die zapfenförmig in den Knochen hineinragt. Die metabolisch inaktiven Chondrozyten sind klein und rund und in die kalzifizierte Matrix eingebettet.

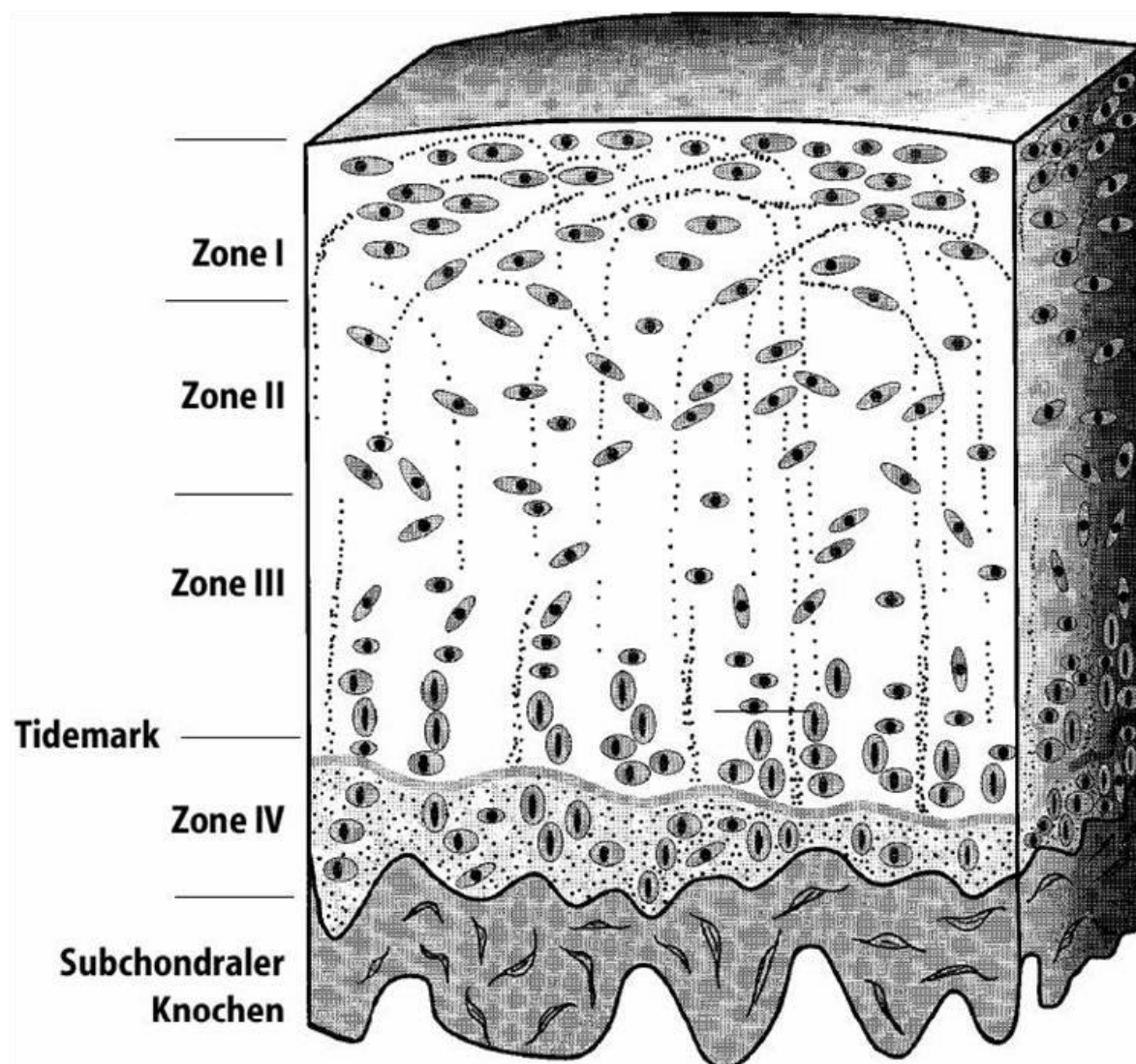


Abbildung 2.1: Aufbau und Struktur des hyalinen Gelenkknorpels: Zone I (oberflächliche Zone), Zone II (mittlere Zone), Zone III (tiefe Zone) und Zone IV (kalzifizierter Knorpel); die gestrichelten Linien zeigen den Verlauf der Kollagenfasern, die Chondrozyten sind entlang dieser Fasern säulenartig ausgerichtet (Quelle: Kneißel 2003)

Hyaliner Knorpel enthält keine Gefäße. Die Ernährung erfolgt durch Diffusion von Nährstoffen aus der Synovialflüssigkeit. Tiefere Knorpelzonen werden auch durch Gefäße des subchondralen Raums ernährt (Rudert und Wirth 1998).

Gelenkknorpel zählt zu den bradytrophen Geweben und besitzt nur geringe Regenerationsmöglichkeiten. Begründet ist dies in der Avaskularität und der Fixierung der Chondrozyten in der extrazellulären Matrix. Die Chondrozyten haben – zumindest beim Erwachsenen – eine sehr begrenzte Fähigkeit zur Zellproliferation. Knorpelschäden heilen daher in den meisten Fällen nicht unter vollständiger Wiederherstellung der anfänglichen Knorpelqualität (Poole 2001).

2.1.2. Traumatische Knorpelveränderungen

Druck- und Zugkräfte können am hyalinen Gelenkknorpel zu traumatischen Veränderungen führen. Solche Veränderungen sind aufgrund des bradytrophen Knorpelstoffwechsels ein Vorläufer arthrotischer Umbauvorgänge (Carter et al. 2004). Als Mechanismen, die dabei zur Schädigung des Knorpels führen, kommen entweder eine direkte Gewalteinwirkung während des Traumas oder eine Veränderung der mechanischen Belastung des Knorpels in Frage (Martin and Buckwalter 2006).

Histopathologie posttraumatischer Knorpelveränderungen

Nach Traumatisierung des Gelenkknorpels kann es im Verlauf zu einer Veränderung der molekularen Zusammensetzung der Knorpelmatrix kommen. Das ausgewogene Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau der extrazellulären Matrix wird gestört. Der Abbau überwiegt die Synthese, obwohl die metabolische Aktivität der Chondrozyten gesteigert ist. Anabole Faktoren wie Transforming Growth Factor- β (TGF- β), Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) und Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) vermitteln den gesteigerten Metabolismus der Chondrozyten. Diese Faktoren werden sowohl von den Chondrozyten als auch von Zellen der Synovialis gebildet (Sandell and Aigner 2001).

Die vermehrte Synthese zum Teil strukturell minderwertiger extrazellulärer Matrixbestandteile (Kollagen Typ-II, -IV, -IX, -XI, Aggrecan) dient der Aufrechterhaltung der knorpelspezifischen Matrix (Poole et al. 2007). Zusätzlich sind in diesem frühen Stadium der Knorpeldestruktion Proteine nachweisbar, die in gesundem Knorpel nicht oder nur sehr wenig vorkommen. Dazu gehören beispielsweise Tenascin C und Chitinase-3-like Protein 1 (Veje et al. 2003; Lorenz et al. 2005). Es wurde bisher nicht

geklärt, ob das vermehrte Vorkommen dieser Proteine durch eine bessere Erreichbarkeit im Rahmen der Matrixdegeneration oder durch eine gesteigerte Synthese zustande kommt. Beiden Proteinen wird eine protektive Rolle im Sinne einer Gegenregulation der Knorpeldestruktion zugesprochen.

Im Verlauf kommt es zudem zur Entstehung von Proliferationsnestern (sogenannte Chondrozytencluster), die als Reaktion auf die Matrixdegeneration und somit als lokaler Reparatursversuch verstanden werden (Horton, Jr. et al. 2005). Wachstumsfaktoren wie Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) und Transforming Growth Factor (TGF) sind wesentliche Modulatoren dieser Chondrozytenproliferation. Sie werden von Chondrozyten freigesetzt, die durch Abbauprodukte der Matrix stimuliert werden (Hardingham et al. 1994; Middleton and Tyler 1992).

Vor allem die Chondrozyten im Bereich der Cluster produzieren das proinflammatorische Interleukin-1 (IL-1), das eine vermehrte Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), Aggrecanasen und anderen katabolen Genen (beispielsweise Kathepsin-B) induziert (Tetlow et al. 2001). Diese Enzyme sind wesentlich am übermäßigen Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt.

Des Weiteren kommt es zu einem umschriebenen Proteoglykanverlust der extrazellulären Matrix, der sich histochemisch vor allem in der oberflächlichen Zone nachweisen lässt (Goldring and Goldring 2007). Der Verlust an Proteoglykanen erklärt sich durch die gesteigerte Aktivität proteolytischer Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen (vor allem MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-13) und Aggrecanasen (insbesondere ADAMTS-5) (Cawston and Wilson 2006; Plaas et al. 2007). Sekundär entsteht eine Schädigung des Kollagennetzwerks, für dessen Abbau hauptsächlich das Enzym Kollagenase-3 (MMP-13) verantwortlich ist (Billinghurst et al. 1997). Kompensatorisch lässt sich in den tiefen Knorpelschichten eine erhöhte Kollagen-II Syntheserate feststellen (Aigner et al. 1992). Durch diese Veränderungen nimmt die Zugfestigkeit des Knorpels ab und es entstehen oberflächliche Aufrauungen und Risse.

Die Folge der beschriebenen molekularen Veränderungen ist letztlich der zunehmende Verlust der Knorpelsubstanz, der im Endstadium zum Freiliegen des darunter liegenden Knochens führt (Sulzbacher 2000).

Tabelle 2.2: Übersicht über die posttraumatischen, histologischen Veränderungen des Knorpels

Initiales Stadium	<ul style="list-style-type: none"> - Kleine Chondrozytencluster - Schwellung
Frühes Stadium	<ul style="list-style-type: none"> - Fokal Chondrozytencluster - Umschriebene Chondrozytennekrosen - Aufrauung der Knorpeloberfläche - Histochemischer Proteoglykanverlust
Intermediäres Stadium	<ul style="list-style-type: none"> - tangentielle und vertikale Risse der Knorpeloberfläche - Chondrozytencluster - Chondrozytennekrosen - Zunehmender Proteoglykanverlust - Duplikatur der Tidemark mit Einsprossen von Gefäßen
Spätes Stadium	<ul style="list-style-type: none"> - Verlust des Knorpels - Osteophytenbildung - Pseudozystenbildung - Markfibrose

Marker posttraumatischer Knorpelveränderungen

Da die molekularen Veränderungen der idiopathischen und posttraumatischen Arthrose große Ähnlichkeit aufweisen, haben sich in der Arthrosenforschung zahlreiche Tiermodelle etabliert, die durch chirurgische Traumatisierung des Gelenks eine Arthrose induzieren (Bendele 2001). Anhand dieser Modelle konnte das veränderte Vorkommen verschiedener Makromoleküle identifiziert werden, die eine Rolle im Rahmen posttraumatischer Knorpelveränderungen spielen. Deren Verteilungsmuster lassen sich mittels immunhistologischer Verfahren untersuchen (Lorenz and Richter 2006).

Nach traumatischer Schädigung des Gelenkknorpels sind vermehrt Kollagenspaltprodukte nachweisbar, die eine Denaturierung der Kollagen-Tripelhelix anzeigen (Stoop et al. 2000). Diese Spaltprodukte kommen in gesundem Knorpel nur zu einem sehr geringen Anteil vor (1,1% des gesamten Kollagen-II) (Hollander et al. 1994). Die Denaturierung des Kollagens beginnt dabei in der Nähe von Chondrozyten in der oberflächlichen Zone des Knorpels und breitet sich im Verlauf in tiefere Schichten aus. Hollander et al. gelang es, einen Antikörper zu entwickeln, der nur mit einem Epitop auf der α -Kette des Kollagens (Col 2- $\frac{3}{4}$ m) reagiert, wenn es in denaturiertem Zustand vorliegt und somit ein hochspezifischer Marker der Kollagen-denaturierung

ist. Aufgrund der Zerstörung des Kollagens nimmt die Zugfestigkeit des Knorpels ab und es kann zu Einrissen und Fibrillationen der Knorpeloberfläche kommen.

Tenascin C, ein extrazelluläres Matrixprotein, das eine Rolle bei der Regulation der Zelladhäsion spielt, ist ein natürlicher Bestandteil der interterritorialen und territorialen Matrix der oberflächlichen und mittleren Zone des menschlichen Knorpels (Pfander et al. 2004) und der oberflächlichen Zone des Rattenknorpels (Mackie and Ramsey 1996). Im Verlauf der idiopathischen Arthrose konnte eine Korrelation zwischen dem Vorkommen von Tenascin C und der Schwere der Arthrose hergestellt werden (Veje et al. 2003). Auch nach traumatischer Schädigung des Gelenkknorpels findet im Tiermodell eine vermehrte Bildung von Tenascin C statt (Pfander et al. 1999). Da Tenascin C der Fibronektin-vermittelten Knorpelresorption entgegenwirkt (Murphy-Ullrich et al. 1996), könnte die vermehrte Expression im Rahmen der Knorpelschädigung einen Reparationsversuch im Bereich der oberflächlichen Knorpelzone darstellen.

Ein weiteres Protein, das nach chirurgisch induzierter Traumatisierung des Gelenkknorpels im Tiermodell vermehrt nachweisbar ist, ist das Chitinase-3-like Protein 1 (CHI3L1; synonym: YKL40). Eine gesteigerte Expression wurde bereits nach sechs Wochen an Hunden mit vorderer Kreuzbandtransektion gezeigt. Die Aufregulation blieb über den gesamten Untersuchungszeitraum (bis 48 Wochen) bestehen (Lorenz et al. 2005). CHI3L1 scheint über die Hemmung der Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-1 vermittelten Knorpeldegeneration eine protektive Rolle nach traumatischer Knorpelschädigung zu spielen (Ling and Recklies 2004). Des Weiteren gilt CHI3L1 als proliferationsstimulierender Wachstumsfaktor für Bindegewebe (Recklies et al. 2002).

2.2. Grundlagen der Stoßwellentherapie

2.2.1. Historische Entwicklung der Stoßwellentherapie

Vor 30 Jahren entdeckten Forssmann et al. die extrakorporale Stoßwellenlithotripsie als Möglichkeit zur nicht-invasiven Behandlung von Patienten mit Steinerkrankungen der Niere und ableitenden Harnwege (Forssmann et al. 1977). 1980 wurde erstmals ein Patient mit Nierensteinen erfolgreich mit Stoßwellen behandelt, ohne dabei wesentliche Schäden am umliegenden Gewebe zu verursachen (Chaussy et al. 1980). Weitere Untersuchungen am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München trugen dazu bei, die extrakorporale Stoßwellenlithotripsie als Standardverfahren in der Urologie einzuführen (Eisenberger and Chaussy 1978; Chaussy et al. 1982; Schmiedt and Chaussy 1984; Brendel 1984).

Ausgehend von den Erfahrungen bei der Behandlung von Nieren- und Harnleitersteinen wurde die extrakorporale Stoßwellentherapie auch als Verfahren zur Behandlung von Steinen in der Gallenblase (Sackmann et al. 1988; Sauerbruch et al. 1986) und dem Gallengang (Sauerbruch and Stern 1989), in der Bauchspeicheldrüse (Howell et al. 1999; Sauerbruch et al. 1987) und den Speicheldrüsen (Iro et al. 1998; Iro et al. 1989) eingeführt.

Die Wirkung der Stoßwellen auf Gewebe des Stütz- und Bewegungsapparates wurde erstmals 1988 von Graff et al. untersucht. Die Autoren gingen der Frage nach, inwieweit die extrakorporale Stoßwellentherapie zur Zertrümmerung von Harnleitersteinen Auswirkungen auf das im Behandlungsbereich liegende Os ilium hat. Zuvor war bei Patienten mit Harnleitersteinen nach Stoßwellenbehandlung eine Auftreibung des Os ilium im Röntgen aufgefallen. Die Autoren konnten im Tiermodell eine primäre Osteozytenschädigung nachweisen, auf die eine Osteoblastenstimulation folgte (Graff et al. 1988). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Wirkung der Stoßwellen auf die Knochenheilung genauer untersucht. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten eine Beschleunigung der Frakturheilung nach Stoßwellenapplikation am Tiermodell beschreiben (Haupt et al. 1992; Johannes et al. 1994), andere hingegen beobachteten eine stoßwelleninduzierte Verzögerung der Osteoneogenese (Augat et al. 1995; Forriol et al. 1994).

Die Einführung der extrakorporalen Stoßwellentherapie in die Orthopädie erfolgte mit Untersuchungen zur Wirkung der Stoßwellen auf Knochenzement im Femurschaft

bei der Hüftgelenksrevisionsarthroplastik (Weber et al. 1987; Weinstein et al. 1988; May et al. 1990). Die Autoren postulierten eine unterstützende Wirkung der Stoßwellentherapie durch Mikrofrakturierung des Knochenzements. Allerdings hat sich dieses Verfahren nicht in der klinischen Anwendung etabliert.

Mit dem Ziel, durch extrakorporale Stoßwellen sklerotische Knochenenden aufzubrechen, Mikrofissuren zu induzieren und die Durchblutung anzuregen, führten Valchanou und Michailov 1991 erste Anwendungen extrakorporaler Stoßwellen am Menschen bei Patienten mit verzögerter Frakturheilung und Pseudarthrosen durch (Valchanou and Michailov 1991). Sie erzielten bei 70 von 82 Patienten eine radiologisch nachweisbare Kallusbildung mit Konsolidierung des Bruchs. Ähnliche Ergebnisse wurden in der Folgezeit von anderen Arbeitsgruppen berichtet (Schleberger and Senge 1992).

Neben der Behandlung der verzögerten Frakturheilung und der aseptischen Pseudarthrose wurden die Behandlung der Tendinosis calcarea der Schulter (Loew et al. 1995; Rompe et al. 1995), der Epicondylitis humeri radialis (Rompe et al. 1996a) und der plantaren Fasziitis (Rompe et al. 1996b) eingeführt. Als neue, noch experimentelle Indikationen gelten die Therapie der aseptischen Hüftkopfnekrose (Wang et al. 2005), der Osteochondrosis dissecans (Marx und Thiele 2003) und die Therapie von heterotopen Ossifikationen (Brissot et al. 2005).

2.2.2. Biophysikalische Grundlagen extrakorporaler Stoßwellen

Physikalische Parameter

Extrakorporale Stoßwellen sind in Wasser erzeugte akustische Druckpulse mit einem spezifischen zeitlichen und räumlichen Verlauf. Sie breiten sich dreidimensional in Medien wie Gas, Flüssigkeit oder Festkörpern aus. Ihr Verlauf ist durch zwei Phasen gekennzeichnet [vgl. Abbildung 2.2]: in der ersten Phase erreicht die Stoßwelle über einen schnellen Druckanstieg innerhalb weniger Nanosekunden (<10 ns) ihr Druckmaximum (bis zu 100 MPa). Die anschließende zweite Phase zeichnet sich durch einen Druckabfall in den negativen Bereich aus (Gerdesmeyer et al. 2002). Am Ende der Stoßwelle wird wieder der Umgebungsdruck erreicht (Folberth et al. 1992). Insgesamt liegt die Dauer einer Stoßwelle bei weniger als 10 μ s.

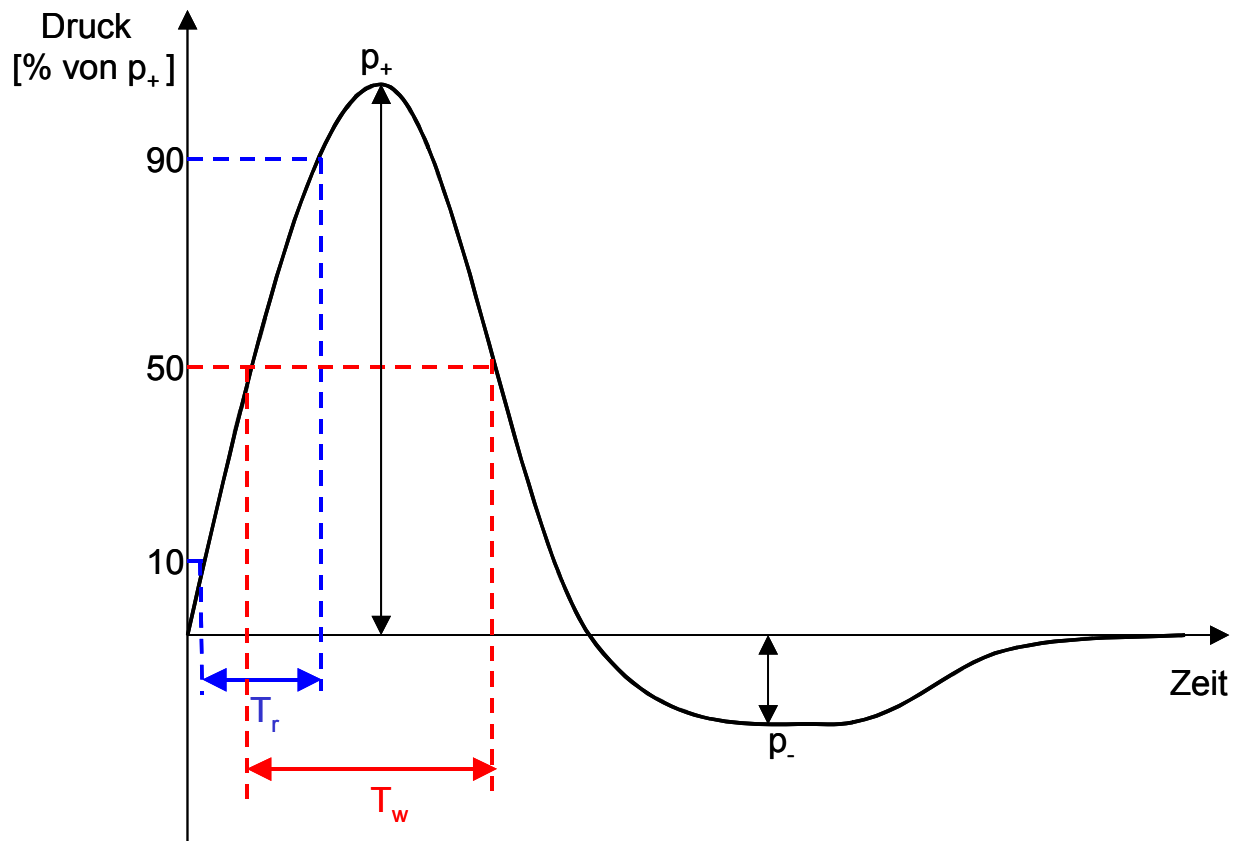


Abbildung 2.2: Zeitliches Druckprofil einer standardisierten Stoßwelle (eigene Darstellung in Anlehnung an Gerdesmeyer et al. 2002)

Im Folgenden werden anhand von Abbildung 2.2 die physikalischen Eigenschaften extrakorporaler Stoßwellen dargestellt (Gerdesmeyer et al. 2002):

- **Positiver Spitzendruck p_+ :** definiert als Differenz zwischen maximalem positiven Spitzendruck und Umgebungsdruck während der ersten Phase der Stoßwelle. p_+ erreicht Werte zwischen 5 und 100 MPa.
- **Negativer Spitzendruck p_- :** definiert als maximaler negativer Spitzendruck während der zweiten Phase der Stoßwelle. p_- erreicht Werte von circa 10% p_+ .
- **Anstiegszeit T_r :** definiert als Intervall, in dem der Druck von 10% p_+ auf 90% p_+ ansteigt. T_r beträgt typischerweise <10 ns.
- **Pulsbreite T_w (synonym: full-width-half-maximum, FWHM):** definiert als Zeitintervall, in dem der Druck erstmals 50% p_+ übersteigt und anschließend (während des exponentiellen Druckabfalls in der ersten Phase) wieder unterschreitet. T_w dauert zwischen 200 ns und 500 ns.

Die Werte von p_+ , p_- , T_r und T_w einer Stoßwelle hängen von der verwendeten Stoßwellenquelle ab.

Bei ihrer Erzeugung werden Stoßwellen auf eine Zielregion fokussiert. Innerhalb dieser Zielregion liegt der Stoßwellenfokus, der eine dreidimensionale Gestalt annimmt. Um das Druckfeld des Stoßwellenfokus zu beschreiben, stehen drei Möglichkeiten zur Verfügung (Ogden et al. 2001):

- Definition des Stoßwellenfokus als derjenige Raum, in dem der Druck mindestens 50% des positiven Spitzendrucks erreicht (-6 dB Isobare). Hierbei nimmt der Fokus eine zigarrenähnliche Form an.
- Definition des Stoßwellenfokus als der Bereich, in dem der Druck mindestens 5 MPa erreicht (5 MPa Isobare).
- Definition des Stoßwellenfokus als der Raum, der sich im Umkreis von 5 mm um den zweiten Fokuspunkt erstreckt [vgl. Abbildung 2.4a,b].

Der Fokus der in dieser Arbeit verwendeten Stoßwellenquelle wurde mit einem Hydrophon (Instrument zur Druckmessung) anhand der -6 dB Isobare gemessen. Er hat eine räumliche Ausdehnung von 31 mm entlang der Längsachse und 3,6 mm entlang der rotationssymmetrischen Querachse [vgl. Abbildung 2.3].

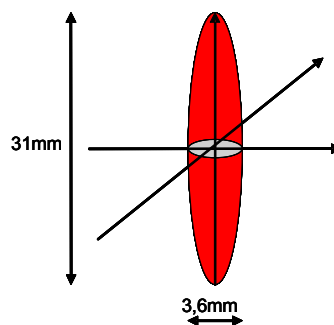


Abbildung 2.3: Darstellung des -6 dB Fokus der Stoßwellenquelle Dornier XL1 (eigene Darstellung in Anlehnung an Ogden et al. 2001)

Um die entstehende Energie bei der Stoßwellenapplikation zu quantifizieren, verwendet man die Einheit Energieflussdichte (angegeben in mJ/mm^2). Sie ist definiert als derjenige Betrag der Stoßwellenenergie, der über die gesamte Dauer der Stoßwelle innerhalb einer Fläche von 1 mm^2 im Stoßwellenfokus gemessen werden kann (Gerdesmeyer et al. 2002). Die Energieflussdichte wird in den meisten Studien zur Charakterisierung der Stoßwelle herangezogen.

Prinzipien der Stoßwellengenerierung

Um fokussierte, extrakorporale Stoßwellen zur klinischen Anwendung zu erzeugen, stehen im Wesentlichen drei Methoden zur Verfügung (Krause 1997). Gemeinsam ist allen Verfahren, dass sie die akustischen Druckpulse der Stoßwelle bündeln und fokussieren. Unterschiede bestehen im zeitlichen Druckverlauf der erzeugten Stoßwelle und in der Geometrie der Wellenausbreitung.

Folgende Darstellung bezieht sich auf Abbildung 2.4 (Ogden et al. 2001):

- *Elektrohydraulisches Prinzip* [vgl. Abbildung 2.4a]: Diese Methode stellt das älteste Verfahren zur Stoßwellengeneration dar. Hierbei werden unter Wasser durch Funkenentladung einer Elektrode Plasmablasen erzeugt. Diese Funkenentladung erfolgt zwischen den Spitzen zweier Elektroden durch Applikation einer Hochspannung (in dieser Arbeit 15 kV). Dadurch wird das umgebende Wasser komprimiert und es kommt zur Entstehung von Stoßwellen. Diese breiten sich konzentrisch aus und werden über eine elliptische Oberfläche gebündelt und fokussiert.
- *Elektromagnetisches Prinzip* [vgl. Abbildung 2.4b]: Hierbei wird durch eine elektromagnetische Spule ein starkes Magnetfeld erzeugt, das eine gegenüberliegende Metallmembran abstößt, welche ein sie umgebendes, flüssiges Medium komprimiert. Mit Hilfe einer akustischen Linse wird die so entstandene Stoßwelle auf die Behandlungszone fokussiert.
- *Piezoelektrisches Prinzip* [vgl. Abbildung 2.4c]: Bei der piezoelektrischen Stoßwellengeneration werden Piezokristalle, die auf der Innenseite einer Kugelschale angeordnet sind, elektrisch entladen. Dadurch kommt es zur Ausdehnung der Kristalle und eine Druckwelle entsteht im umgebenden Wasser, die sich auf dem Weg zum Zentrum der Kugelschale zur Stoßwelle aufsteilt. Die geometrische Anordnung der Kristalle ermöglicht sowohl eine sehr genaue Fokussierung der Stoßwelle als auch eine hohe Energieflussdichte innerhalb eines definierten Fokusareals.

Für diese Arbeit wurde die Stoßwellenquelle Typ XL1 der Firma Dornier (Wessling, Deutschland) verwendet, die nach dem elektrohydraulischen Prinzip arbeitet.

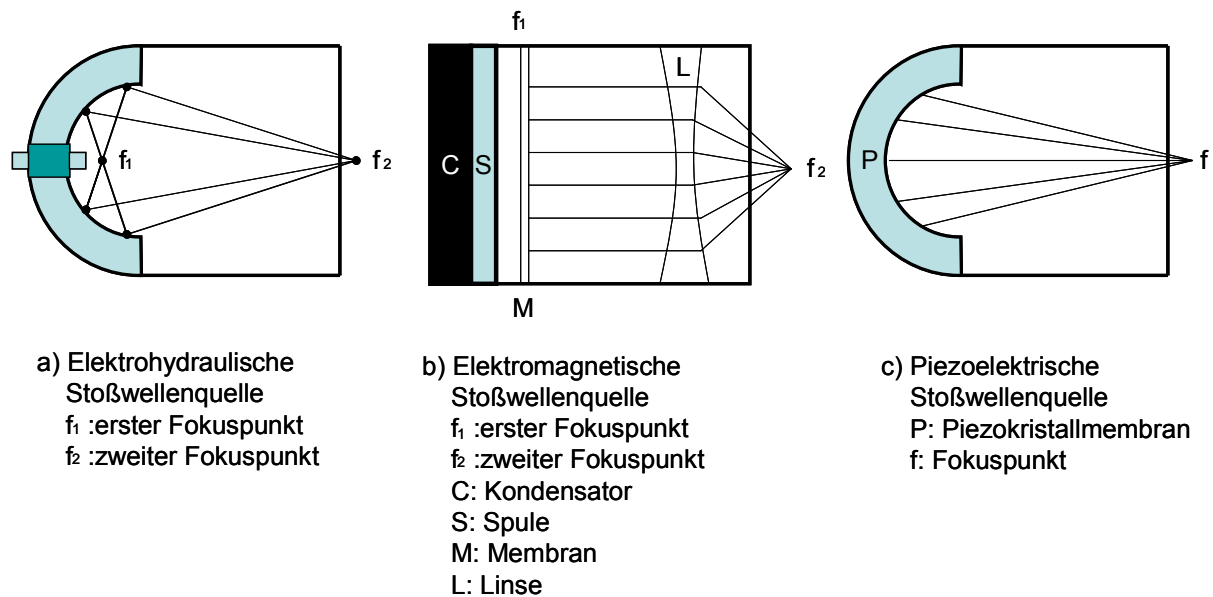


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der verschiedenen Prinzipien der Stoßwellenerzeugung
 (eigene Darstellung in Anlehnung an Gerdesmeyer et al. 2002)

Die heute am Weitesten in der klinischen Orthopädie verbreitete Stoßwellentechnologie stellen die sogenannten radialen Stoßwellen dar. Diese werden pneumatisch durch Beschleunigung eines Projektils erzeugt und breiten sich radial vom Applikationsort an der Hautoberfläche in die Tiefe des Körpers aus. Im Gegensatz zu fokussierten Stoßwellen verlieren sie mit der Eindringtiefe ihre Energiedichte. Da fast alle Indikationen zum Einsatz extrakorporaler Stoßwellen am Stütz- und Bewegungsapparat in der Nähe der Hautoberfläche liegen, hat die radiale Stoßwellentherapie in den letzten Jahren deutlich an Bedeutung gewonnen und vielerorts auch die fokussierte Stoßwellen erzeugenden Geräte abgelöst (Cacchio et al. 2006).

Biologische Effekte extrakorporaler Stoßwellen

Die biologische Wirkung extrakorporaler Stoßwellen lässt sich in zwei Anteile gliedern (Gerdesmeyer et al. 2002; Ogden et al. 2001): die direkte Wirkung an Grenzflächen und die indirekte Wirkung der Kavitation.

Direkte Wirkung: Eine direkte Kraftentfaltung der Stoßwellen findet am Übergang von Grenzflächen zweier Gewebearten mit unterschiedlicher akustischer Impedanz statt. Die akustische Impedanz eines Mediums ist definiert als das Produkt von Dichte und Schallgeschwindigkeit innerhalb dieses Mediums (angegeben in Ns/m^3). Extrakorporale Stoßwellen werden an Grenzflächen unterschiedlicher Impedanz gebrochen. Mit

der Höhe des Impedanzunterschiedes steigt der Anteil einer Stoßwelle, der an der Grenzfläche zweier Medien reflektiert wird.

Tabelle 2.3: Akustische Impedanz verschiedener Stoffe

Stoff	Impedanz in 10^3 Ns/m^3
Luft	429
Fett	1380
Wasser	1480
Blut	1620
Muskel	1650 - 1740
Knochen	3200 - 7400

Durch diese Eigenschaft kann die Wirkung von Stoßwellen in der Tiefe von Geweben erzeugt werden, ohne dabei das durchlaufene Gewebe maßgeblich zu beeinträchtigen. Für die Stoßwellenapplikation am Stütz- und Bewegungsapparat bedeutet dies, dass der Hauptanteil der Wirkung der Stoßwellen entweder an der Grenzfläche zwischen Weichgewebe beziehungsweise Knorpel und Knochen stattfindet, oder wie beispielsweise bei der Tendinosis calcarea der Schulter zwischen Sehne und Kalkdepot. Der Hauptanteil der Kraftentwicklung erfolgt jeweils im Gewebe größerer akustischer Impedanz, das heißt im Knochen und im Kalkdepot.

Ergänzend sei darauf hingewiesen, dass Stoßwellen als weitere direkte Wirkung durch hohe Druckamplituden und Wechselwirkung von Kompression und Dekompression einen thermischen Effekt im Gewebe auslösen. Es kommt zu einer sehr kurzen Temperaturerhöhung, die vermutlich keine klinische Relevanz hat (Staudenraus 1995).

Indirekte Wirkung: Entsteht in einer Flüssigkeit ein Druck, der niedriger ist als der Umgebungsdruck, so unterliegt die Flüssigkeit einer lokalen Zugbeanspruchung. Durch diesen Zug können in der Flüssigkeit gasgefüllte Hohlräume entstehen. Dieses Phänomen wird als Kavitation bezeichnet und ist in der zweiten Phase der Stoßwelle zu beobachten. Es kommt zum Unterdruck und Kavitationsblasen entstehen. Wenn sich die Druckverhältnisse nach der Stoßwellenpassage normalisiert haben, kommt es zum Kollaps dieser Blasen. Bei diesem asymmetrischen Kollaps entstehen so genannte Jetstreams, Flüssigkeitsströme mit einer Geschwindigkeit von bis zu 800 m/s. Diese Jetstreams führen ebenfalls zur

Freisetzung kinetischer Energie an den Grenzflächen zweier Medien. Folge kann beispielsweise die Perforation kleiner Gefäße sein, die zu den häufig beobachteten Hämatomen nach Stoßwellenbehandlung führt.

2.2.3. Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf biologische Gewebe

Wirkungen auf Knochen

Eine Untersuchung der Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf Knochen wurde erstmals von der urologischen Arbeitsgruppe unter der Leitung von Graff in Bochum durchgeführt, um herauszufinden, ob das bei der Stoßwellenlithotripsie im Behandlungsbereich liegende Os Ilium durch die Stoßwellenapplikation beeinträchtigt wird (Graff et al. 1988). Dabei konnte eine primäre Osteozytenschädigung und Knochenmarknekrose nachgewiesen werden, die innerhalb von 72 Stunden in eine Osteoblastenstimulation überging.

Das osteogene Potential extrakorporaler Stoßwellen konnte in zahlreichen folgenden Studien am Tiermodell bestätigt werden, die alle eine kortikale Knochenneubildung nach Stoßwellenapplikation zeigten (Delius et al. 1995; Ikeda et al. 1999). Diese Knochenneubildung fand dabei nicht nur im Fokusbereich der Stoßwelle, sondern auch außerhalb statt (Tischer et al. 2002). Maier et al. gelang es, eine Dosis-Wirkungs-Beziehung von Stoßwellen auf das Ausmaß der Knochenneubildung abzuleiten. Mit Erhöhung der Energieflussdichte nahm auch das Ausmaß der Knochenneubildung am intakten Knochen zu (Maier et al. 2004).

Der genaue molekulare Wirkungsmechanismus extrakorporaler Stoßwellen bei der Knochenneubildung ist jedoch noch nicht geklärt. Als verschiedene Möglichkeiten wurden das Entstehen von Mikrofrakturen (Ikeda et al. 1999), eine Zunahme der regionalen Knochendurchblutung und des Knochenstoffwechsels (Maier et al. 2002) sowie eine erhöhte Ausschüttung der Substanz P diskutiert (Maier et al. 2003). Als periphere Wirkung des Neurotransmitters Substanz P ist unter anderem eine Osteoblastenstimulation nachgewiesen worden, die zu der beschriebenen Knochenneubildung führen könnte (Goto et al. 1998). Maier et al. zeigten, dass bei einer Energieflussdichte von $0,5 \text{ mJ/mm}^2$ auch eine periostale Knochenneubildung ohne kortikale Mikrofrakturierung und Periostabhebung erfolgt (Maier et al. 2003).

Neben der Knochenneubildung konnten auch schädigende Effekte von Stoßwellen auf Knochen gezeigt werden. Stoßwellen verursachen einen destruktiven, dosisab-

hängigen Effekt auf die Kortikalis des Kaninchenfemurs, der bis zur Fraktur reichen kann. Ausgeprägte Schäden entstanden nach Applikation von Stoßwellen mit einer Energieflussdichte von $0,6 \text{ mJ/mm}^2$ (Kaulesar Sukul et al. 1993). Außerdem wurden in verschiedenen Studien Periostabhebung, subperiostale Blutungen und Schädigungen des Markraums nach Stoßwellenapplikation am Tiermodell festgestellt (Delius et al. 1995; Ikeda et al. 1999; Maier et al. 2002).

Über die Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf die Wachstumsfuge liegen keine eindeutigen Ergebnisse in der Literatur vor. Von Van Arsdalen et al. und Nassenstein et al. konnte kein schädigender Effekt von Stoßwellen auf die Epiphysenfuge des Kaninchenfemurs dargelegt werden (Van Arsdalen et al. 1991; Nassenstein et al. 2005). Wobei Letztere Stoßwellen einer niedrigen Energieflussdichte verwendeten. Yeaman et al. konnten hingegen eine deutliche Dysplasie der Wachstumsfuge von Ratten nach Applikation von Stoßwellen einer hohen Energieflussdichte nachweisen (Yeaman et al. 1989).

Auch die Wirkung von Stoßwellen auf die Knochenheilung wurde untersucht. Die Ergebnisse tierexperimenteller Untersuchungen an verschiedenen Osteotomiemodellen waren widersprüchlich. Einige Autoren konnten keinen Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren feststellen (Augat et al. 1995). Andere berichteten von einer Verzögerung (Forriol et al. 1994), aber auch eine Beschleunigung der Heilung wurde beobachtet (Haupt et al. 1992; Hsu et al. 2003). Johannes et al. stellten im Tiermodell eine beschleunigte Pseudarthrosenheilung fest (Johannes et al. 1994).

Eine weitere Untersuchung zur Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf die Knochenheilung führten Chen et al. durch. Sie konnten zeigen, dass bei der Behandlung eines segmentalen Defekts am Femur der Ratte eine gesteigerte Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in Osteoblasten und Chondrozyten nach einmaliger Applikation von Stoßwellen der Energieflussdichte $0,26 \text{ mJ/mm}^2$ stattfand. Die Autoren sahen in diesen Ergebnissen einen möglichen Ansatz für die Anwendung extrakorporaler Stoßwellen im Rahmen von Tissue Engineering (Chen et al. 2004).

Wirkungen auf Knorpel

Zum Zeitpunkt der Recherche lag nur eine Studie vor, in der die Wirkung von Stoßwellen auf Gelenkknorpel *in vivo* untersucht wurde. Es wurden jeweils die linken,

lateralen Femurkondylen 100 Tage alter (nicht ausgewachsener) Kaninchen mit Stoßwellen (EFD 1,2 mJ/mm²) behandelt. Diese wurden nach 0, 3, 12 und 24 Wochen makroskopisch, radiologisch und histologisch beurteilt. Die Autoren konnten keine pathologischen Veränderungen feststellen (Vaterlein et al. 2000).

Wirkungen auf Zellkulturen

Obwohl Untersuchungen zur Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf Zellkulturmodelle die physiologischen Bedingungen *in vivo* nur simulieren, tragen sie dazu bei, die genaueren biochemischen Wirkmechanismen der Stoßwellen aufzuklären. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass es bei der Applikation von Stoßwellen mit hoher Energieflussdichte (ab 0,31 mJ/mm²) auf Osteoblastenzellkulturen zu einer Zerstörung kommt, während die Verwendung von Stoßwellen einer niedrigeren EFD zur osteoblastären Stimulation führt. Gleichzeitig konnte in diesen Studien eine verminderte Kollagen-I Synthese nach Stoßwellenbehandlung nachgewiesen werden (Kusnierczak et al. 2000; Martini et al. 2003a; Martini et al. 2003b).

Bei der Applikation von Stoßwellen auf Knochenmarkzellen (EFD 0,16 mJ/mm²) war ebenfalls eine erhöhte osteoblastäre Differenzierungsrate feststellbar, die zum einen mit einer Aktivierung der Ras-Kaskade und folgender vermehrter Expression des osteogenen Transkriptionsfaktors Cbfa-1 einherging (Wang et al. 2001) und zum anderen mit einer messbar erhöhten Produktion des Wachstumsfaktors TGF-β1 assoziiert war (Wang et al. 2002).

Die Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf Chondrozyten in Zellkultur wurde in verschiedenen Arbeiten untersucht. Dosisabhängig kam es dabei zur Zerstörung der Chondrozyten (Murata et al. 2007; Renz and Rupp 2008). Allerdings konnte dieser Effekt deutlich verringert werden, indem die Zellen in Alginat gebettet wurden. Nach Applikation von Stoßwellen der Energieflussdichte 0,26 mJ/mm² konnte keine signifikante Schädigung der Chondrozyten nachgewiesen werden (Renz and Rupp 2008). Da die viskoelastischen Eigenschaften von Alginat die des Gelenkknorpels eher wiedergeben als eine Zellsuspension, diskutierten die Autoren eine risikofreie Anwendung von Stoßwellen am Gelenkknorpel.

Murata et al. zeigten des Weiteren eine Steigerung des Gentransfers in Chondrozyten nach Applikation extrakorporaler Stoßwellen. Die Autoren sahen darin einen

möglichen Ansatz zur Heilung von Krankheiten des Gelenkknorpels (Murata et al. 2007).

An Pferdeknorpelpräparaten wurde eine verminderte Lebensfähigkeit, eine gesteigerte Membrandurchlässigkeit (Byron et al. 2005) und eine verringerte Glykosaminoglykansynthese (Benson et al. 2007) 48 Stunden nach Stoßwellenapplikation gezeigt. Aufgrund dieser Befunde empfehlen die Autoren eine zurückhaltende Anwendung extrakorporaler Stoßwellen vor allem hoher Energieflussdichten im Bereich des Gelenkknorpels.

2.2.4. Klinische Anwendung extrakorporaler Stoßwellen

Trotz der zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse der Grundlagenforschung wurde die Stoßwellentherapie in das Behandlungsregime verschiedener orthopädischer Krankheitsbilder aufgenommen. Allerdings existieren bis heute keine einheitlichen Therapieempfehlungen und Behandlungsschemata. Im Allgemeinen werden Stoßwellen einer Energieflussdichte (EFD) um $0,08 \text{ mJ/mm}^2$ für die Behandlung der Epicondylitis humeri radialis (Maier et al. 2000a; Maier et al. 2001) und der plantaren Fasziiitis (Maier et al. 2000a; Maier et al. 2000c) verwendet. Bei der Therapie der Tendinosis calcarea der Schulter kommen Stoßwellen sehr unterschiedlicher EFD zum Einsatz. Cacchio et al. verwendeten beispielsweise Stoßwellen der EFD $0,1 \text{ mJ/mm}^2$ und Hsu et al. applizierten Stoßwellen einer EFD von $0,55 \text{ mJ/mm}^2$ zur Behandlung der Tendinosis calcarea der Schulter (Cacchio et al. 2006; Hsu et al. 2008). Aseptische Pseudarthrosen (Schoellner et al. 2002) und im Rahmen klinischer Studien auch Hüftkopfnekrosen (Wang et al. 2005) werden mit Stoßwellen ab einer EFD von $0,3 \text{ mJ/mm}^2$ behandelt.

2.2.5. Nebenwirkungen der extrakorporalen Stoßwellentherapie

Der hyaline Gelenkknorpel liegt bei der Applikation von extrakorporalen Stoßwellen häufig im Behandlungsgebiet. Insbesondere bei der Therapie der Tendinosis calcarea der Schulter, der Hüftkopfnekrose und der aseptischen Pseudarthrose mit extrakorporalen Stoßwellen kann es zu einer ungewollten Mitbehandlung des Gelenkknorpels kommen. Dabei kommen häufig hohe Energieflussdichten um $0,5 \text{ mJ/mm}^2$ zum Einsatz. Für die Anwendung von Stoßwellen dieser Energieflussdichte konnten bereits deutliche Nebenwirkungen am Knochen im Tierversuch gezeigt werden. Es kam zu Schädigungen des Periosts, der Kortikalis und des Markraums

(Deliuss et al. 1995; Ikeda et al. 1999; Maier et al. 2002). Auch Frakturen wurden beobachtet (Kaulesar Sukul et al. 1993). Des Weiteren können in Sehnengewebe Nekrosen auftreten (Rompe et al. 1998). Yeaman et al. konnten dysplastische Veränderungen der Epiphysenfuge nach Stoßwellenapplikation nachweisen (Yeaman et al. 1989).

Da Gelenkknorpel zu den bradytrophen Geweben zählt und daher nur über begrenzte Regenerationsmöglichkeiten verfügt, ist es wichtig, die biologische Wirkung extrakorporaler Stoßwellen am Gelenkknorpel zu kennen. Vaterlein et al. untersuchten erstmals den Gelenkknorpel unreifer Kaninchen nach Applikation von Stoßwellen der Energieflussdichte $1,2 \text{ mJ/mm}^2$ (Vaterlein et al. 2000). Die Autoren konnten keine histologisch nachweisbaren Veränderungen des hyalinen Knorpels feststellen.

In der Zellkultur ergab sich kein signifikanter Schaden nach Applikation extrakorporaler Stoßwellen der Energieflussdichte $0,26 \text{ mJ/mm}^2$ an Chondrozyten, die in Alginat eingebettet waren (Renz and Rupp 2008). Andere *in vitro* Untersuchungen zeigten eine Verminderung der Glykosaminoglykansynthese nach Behandlung mit extrakorporalen Stoßwellen (Benson et al. 2007).

Die genaue biologische Wirkung extrakorporaler Stoßwellen *in vivo* ist bisher nicht bekannt und soll deshalb in der vorliegenden Arbeit weiter untersucht werden.

3. Material und Methoden

Der tierexperimentelle Teil der Arbeit wurde im Institut für chirurgische Forschung des Klinikums Großhadern der Universität München durchgeführt. Die histologischen und immunhistologischen Auswertungen erfolgten im Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie im Klinikum Großhadern der Universität München. Alle Untersuchungen erfolgten unter Beachtung der Tierschutzbestimmungen und wurden von der Regierung Oberbayern mit Sitz in München genehmigt.

3.1. Tiermodell

3.1.1. Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten insgesamt 20 zehn bis zwölf Wochen alte, männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht zwischen 350g und 400g (Fa. Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere wurden im zentralen Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung (Walter Brendel Institut) im Klinikum Großhadern der Universität München gehalten (zwölfstündiger Rhythmus von Licht und Dunkelheit; konstant 21°C). Alle Tiere hatten während der Versuchsdauer freien Zugang zu Trinkwasser und Trockenfutter (Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse der Fa. Ssniff, Soest, Deutschland). Des Weiteren wurden die Tiere jeweils zu viert in einem separaten Käfig untergebracht. Zu jeder Zeit des Versuchs konnten sich die Tiere im Käfig frei bewegen.

3.1.2. Gruppeneinteilung

Die Tiere wurden zufällig in drei Gruppen zu je 6 Ratten verteilt [vgl. Tabelle 3.1]. Zwei Tiere wurden als Kontrollen einer Scheinbehandlung zugeführt (Gruppe IV).

Tabelle 3.1: Einteilung der Versuchstiere

Gruppe	I	II	III	IV
Versuchsdauer	1 Woche	4 Wochen	10 Wochen	4 Wochen
Anzahl der Tiere	6	6	6	2

Die Gruppen I bis III wurden mit 1500 Impulsen der Stoßwellenquelle XL1 der Firma Dornier (Wessling, Deutschland) mit der Energieflussdichte $0,5 \text{ mJ/mm}^2$ am rechten Hüftgelenk behandelt. Die Tiere der Gruppe IV wurden einer vergleichbaren Behandlung ohne Applikation von Stoßwellen ausgesetzt.

Zusätzlich wurde bei allen Tieren einen Tag vor und einen Tag nach Stoßwellenapplikation eine Kontaktradiografie durchgeführt. Bei Gruppe III fand eine weitere Kontaktradiografie am Tag vor der Hüftkopfentnahme statt.

3.1.3. Anästhesie der Versuchstiere

Sowohl zur Stoßwellentherapie als auch zur Kontaktradiografie erhielten die Tiere je nach Gewicht zur Analgosedierung ein Benzodiazepin-Opiat Mischpräparat, das intramuskulär in den Oberschenkel injiziert wurde [vgl. Tabelle 3.2].

Tabelle 3.2: Medikamente zur Narkose (KG=Körpergewicht)

Präparat	Domitor® 1 mg/ml (Fa. Pfizer)	Midazolam ratio- pharm® 5 mg/ml	Fentanyl®-Janssen 0,05 mg/ml
Dosierung	0,15 ml/kg KG	0,4 ml/kg KG	0,1 ml/kg KG

Nach Durchführung der jeweiligen Behandlung wurde die Narkose durch Gabe zweier Benzodiazepin-Antagonisten subkutan beendet [vgl. Tabelle 3.3].

Tabelle 3.3: Medikamente zur Beendigung der Narkose (KG=Körpergewicht)

Präparat	Anexate® 0,1 mg/ml (Fa. Roche)	Antisedan® 5 mg/ml (Fa. Pfizer)
Dosierung	0,15 ml/kg KG	2 ml/kg KG

Um eine adäquate Analgesie im Anschluss an die Stoßwellenbehandlung zu gewährleisten, wurde jedem Tier vor Abschluss der Narkose eine einmalige Dosis Novalgine® subkutan verabreicht [vgl. Tabelle 3.4].

Tabelle 3.4: Dosierung Novalgin (KG=Körpergewicht)

Präparat	Novalgin® (Fa. Hoechst)
Dosierung pro kg KG	50-70 mg

3.1.4. Durchführung der Kontaktradiografie

Um knöcherne Veränderungen durch die Stoßwellenbehandlung zu untersuchen, wurde von jedem Versuchstier vor und nach Stoßwellenbehandlung eine Kontaktradiografie angefertigt.

Für die Röntgenaufnahmen wurde ein Faxitron der Firma Rohde&Schwarz (Memmingen, Deutschland) im anatomischen Institut der medizinischen Fakultät der Universität München verwendet. Alle Tiere erhielten für die Dauer der Aufnahme eine intramuskuläre Anästhesie [vgl. Kapitel 3.1.3]. Nach Wirkungseintritt der Narkose wurden die Tiere im Faxitron so gelagert [vgl. Abbildung 3.1], dass beide Hüftgelenke im Zentrum der Röntgenstrahlen lagen. Nach Abschluss der Aufnahme (Dauer ca. eine Minute) wurde die Narkose beendet [vgl. Kapitel 3.1.3].

Anhand der angefertigten Kontaktradiografien wurde der Abstand der beiden Hüftköpfe zueinander jeweils vom Zentrum des Hüftkopfes aus gemessen.



Abbildung 3.1: Positionierung der Tiere im Faxitron

3.1.5. Durchführung der Stoßwelle

Die Stoßwellenapplikation wurde in tiefer Analgosedierung [vgl. Kapitel 3.1.3] durchgeführt. Als Stoßwellenquelle diente der Experimental-Lithotrypter Typ XL1 der Firma Dornier (Wessling, Deutschland). Nach Wirkungseintritt der Narkose wurden

die Ratten über dem Fokusgebiet (rechtes Hüftgelenk) rasiert. Die Lage des Hüftgelenks wurde zunächst durch Tastbefund verifiziert und markiert. Alle Ratten wurden mittels einer eigens angefertigten Konstruktion so im Wasserbecken der Stoßwelle befestigt, dass jeweils das rechte Hüftgelenk der Stoßwellenapplikation zugänglich war und das linke Hüftgelenk teilweise sowie der restliche Körper durch eine Platte aus 4 mm dickem Polyethylen von den Stoßwellen abgeschirmt war [vgl. Abbildung 3.2]. Aufgrund der Größe des Focus der verwendeten Stoßwellenquelle von 3,6 mm x 31 mm war eine komplette Abschirmung des linken Hüftgelenks nicht möglich. Danach wurde das Becken mit 37°C warmem, entgastem Wasser (Sauerstoffgehalt < 2 mg/l) gefüllt, bis das rechte Bein vollständig mit Wasser bedeckt war. Der Fokus der Stoßwellenquelle wurde dann unter Laserkontrolle auf das rechte Hüftgelenk eingestellt. Dazu dienten zwei im Winkel von 90° zueinanderstehende Laserpointer, deren Schnittpunkt den Fokus kennzeichnete. Anschließend erfolgte die Applikation von 1500 Impulsen bei 1 Hz mit einer Energieflussdichte von 0,5 mJ/mm². Nach Durchführung der Stoßwelle wurde den Ratten zur Analgesie eine einmalige Dosis Novalgin® subkutan [vgl. Kapitel 3.1.3] verabreicht. Die Behandlung dauerte insgesamt etwa 35 Minuten. Im Anschluss wurden die Ratten nach Beendigung der Narkose [vgl. Kapitel 3.1.3] in ihren Käfigen für eine Stunde auf einer Heizdecke gewärmt und getrocknet.

Die Tiere der Gruppe IV wurden der gleichen Prozedur ohne Applikation von Stoßwellen unterzogen.

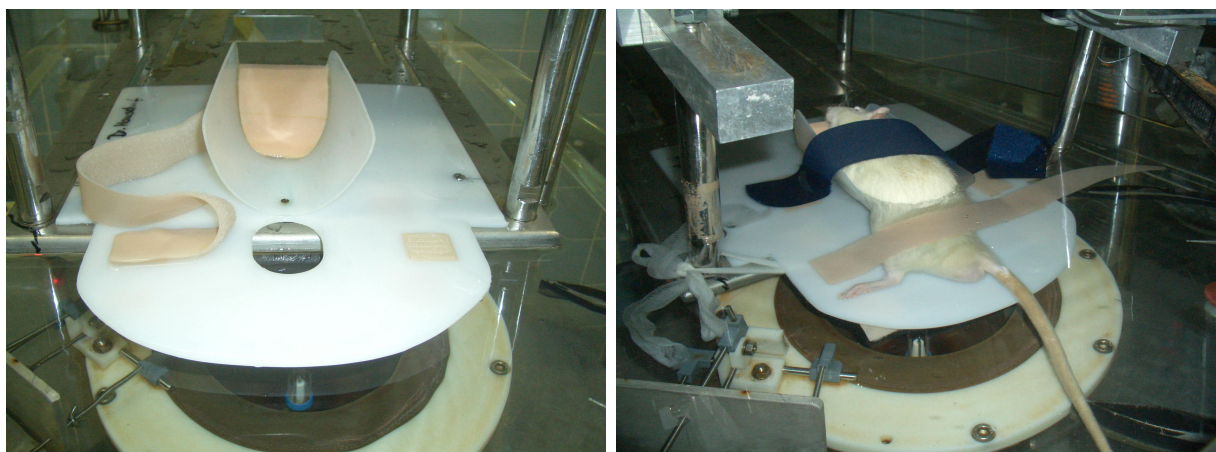


Abbildung 3.2: Halteschale zur Stoßwellenapplikation links;
Befestigung der Tiere in Polyethylenschale rechts

3.1.6. Präparation der Hüftköpfe

Die Tötung der Tiere erfolgte nach Ablauf des jeweiligen Zeitraumes, also entweder eine, vier oder zehn Wochen nach Stoßwellenapplikation, in Narkose [vgl. Kapitel 4.1.3.] mit 2 ml Narcoren® (Pentobarbital, Fa. Merial, Hallbergmoos, Deutschland) intraperitoneal.

Danach wurden beide Hüftköpfe frei präpariert, im Hüftgelenk exartikuliert und mit dem proximalen Teil des Femurs entnommen. Alle Hüftköpfe wurden zunächst entlang der Längsachse (in der Frontalebene) mit dem Meißel halbiert.

Die eine Hälfte diente der histologischen und immunhistochemischen Untersuchung und wurde für 24h bei 4°C in Fixierlösung (3% Dextran from Leuconostoc (Fa. Fluka, Buchs, Schweiz), 4% Paraformaldehyd (CH₂O)_n in PBS (137mM NaCl, 27mM KCl, 83mM Na₂HPO₄·12H₂O, 5mM KH₂PO₄; pH 7.4)) konserviert. Anschließend wurden die Hüftköpfe für vier Wochen zur Dekalzifikation bei einwöchigem Wechsel der Entkalkungslösung (150g EDTA (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈·2 H₂O, Fa. AppliChem, Darmstadt, Deutschland), 5g Paraformaldehyd, 15g NaOH in 1l PBS bei pH 8) aufbewahrt. Der Fortschritt der Dekalzifikation wurde radiologisch kontrolliert. Die Präparate wurden anschließend in Paraffin eingebettet, mit dem Mikrotom Ultracut 2035 (Fa. Leica, Nußloch, Deutschland) 2µm dick geschnitten und auf SuperFrost® Plus Objektträger (Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht.

Um Kryoschnitte anfertigen zu können, wurde bei der zweiten Hälfte der Hüftköpfe der Knorpel vom Knochen getrennt und in Tissue Tec® (Miles Inc., Ohio, USA) mit Flüssigstickstoff asserviert und bei -80°C aufbewahrt. Die Knorpelstücke wurden an einem Gefriermikrotom (Fa. Leica, Nußloch, Deutschland) bei -20°C geschnitten und auf mit Silane beschichtete Objektträger aufgebracht.

3.2. Histologie und Immunhistochemie

3.2.1. Entparaffinierung der histologischen Schnitte

Die auf Objektträger aufgebrachten Paraffinschnitte wurden jeweils vor den histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen entparaffiniert. Hierzu wurden die Schnitte dreimal für jeweils fünf Minuten in 100% Xylol (Fa. Merck, Darmstadt,

Deutschland) gebadet. Danach wurden die Schnitte nacheinander für je fünf Minuten in 100%, 70% und 40% Ethanol (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) rehydriert. Anschließend konnten die Präparate für die jeweiligen Untersuchungen verwendet werden.

3.2.2. HE-Färbung

Um eine morphologische Übersicht der Präparate zu gewinnen, wurde eine Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung angefertigt. Die Präparate wurden wie in Kapitel 3.2.1 angegeben entparaffiniert. Nach kurzem Spülen mit Leitungswasser wurden die Paraffinschnitte für drei Minuten in Mayers Hämalaunlösung (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Die Gegenfärbung erfolgte für 15 Minuten in Eosin Y (Fa. Sigma, Buchs, Schweiz). Anschließend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Zur Fixierung und Aufhellung wurde zweimal in Xylol gewaschen und zuletzt mit Eukitt® (Fa. Kindler, Freiburg, Deutschland) eingedeckt.

3.2.3. Safranin-O/Fast Green Färbung

Zur Darstellung der Proteoglykane im Gelenkknorpel wurde eine Safranin-O/Fast Green Färbung durchgeführt. Vorbereitend wurden die histologischen Schnitte entparaffiniert [vgl. Kapitel 3.2.1]. Dann wurde zunächst für zehn Minuten in Safranin-O (0,2g Safranin T Nr. 84120 (Fa. Fluka, Buchs, Schweiz), 1ml Eisessig (Fa. VWR International, Darmstadt, Deutschland) in 100ml Aqua dest.) gefärbt und nach kurzem Spülen mit destilliertem Wasser mit Fast Green (0,04g Echt Grün FCF 1A304 (Fa. Chroma, Münster, Deutschland), 0,2ml Eisessig in 100ml Aqua dest.) für 5-15 Sekunden gegengefärbt. Zum Auswaschen des überschüssigen Fast Green wurde mit 100% Ethanol gespült. Nach zweimaligem Fixieren in Xylol für je fünf Minuten wurden die Präparate eingedeckt (Eukitt®, Fa. Kindler, Freiburg, Deutschland).

3.2.4. Auswertung der histologischen Präparate

Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte an dem Lichtmikroskop Axioskop 40 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

Die HE Färbung diente der morphologischen Übersicht. Dabei lagert sich das positiv geladene Hämalaun an die sauren Bestandteile der DNS an und stellt damit die Kernfärbung dar. Es entsteht eine tiefblaue Farbe. Eosin ist negativ geladen und

bindet deshalb an positiv geladene Gewebestandteile (vor allem Eiweiße) des Zytoplasmas. Die Farbe ist blass rot.

Safranin-O färbt saure Mukopolysaccharide im Gewebe. Der kationische Farbstoff bindet sich an die polyanionischen Glykosaminoglykane des Knorpels und nicht an das Kollagen. Die Farbintensität (rot) ist dabei proportional zum Proteoglykangehalt des Knorpels. Es handelt sich somit um ein semiquantitatives Verfahren. Fast Green diente als Gegenfärbung (graugrüne Darstellung des Zytoplasmas). Zur Beurteilung der mit Safranin-O gefärbten Präparate wurden die von Mankin etablierten Kriterien herangezogen und alle Präparate verblindet beurteilt [vgl. Tabelle 3.5].

Tabelle 3.5: Histologisches Grading anhand der Safranin-O Färbung (nach: Mankin et al. 1971)

I. Knorpelstruktur	Grad
a. Normal	0
b. Unregelmäßigkeiten der Oberfläche	1
c. Pannus/Unregelmäßigkeiten der Oberfläche	2
d. Risse bis in die Übergangszone	3
e. Risse bis in die radiale Zone	4
f. Risse bis in die kalzifizierte Zone	5
g. Vollständige Auflösung	6
II. Zellgehalt	Grad
a. Normal	0
b. Diffuse Zellvermehrung	1
c. Vorkommen von Zellklonen	2
d. Zellverminderung	3
III. Safranin-O Färbung	Grad
a. Normal	0
b. Leichte Verminderung	1
c. Mäßige Verminderung	2
d. Schwere Verminderung	3
e. Keine Färbung erkennbar	4
IV. Integrität der Tidemark	Grad
a. Intakt	0
b. Überschreitung durch Blutgefäße	1
Insgesamt	0-14

3.2.5. Immunhistochemie

Um traumatische Veränderungen des Knorpels nach Stoßwellenbehandlung nachzuweisen, wurde eine immunhistochemische Darstellung der extrazellulären Matrixproteine Tenascin C und Chitinase-3-like Protein 1 (CHI3L1) und des Kollagenspaltproduktes Col 2- $\frac{3}{4}$ m durchgeführt. Für die Darstellung des Antikörpersignals wurde

die indirekte Färbemethode angewendet. Hierbei erfolgt zunächst die Anheftung eines Primärantikörpers an das zu untersuchende Antigen. In einem zweiten Schritt wird ein Enzym-konjugierter Sekundärantikörper an den Fc-Teil des Primärantikörpers angelagert. Als Substrat für die an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase wurde Wasserstoffperoxid verwendet. Die bei dieser Reaktion frei werdenden Protonen oxidieren das vorher farblose AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) unter Bildung von Wasser zu einem rosenroten Endprodukt [vgl. Abbildung 3.3].

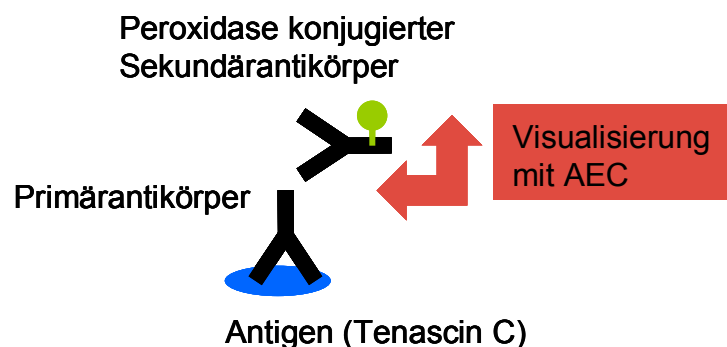


Abbildung 3.3: Indirekte immunhistologische Färbemethode

Tenascin C

Die entparaffinierten Schnitte [vgl. Kapitel 3.2.1] wurden in 0,5% H_2O_2 in Methanol für zehn Minuten inkubiert, um eine Blockade der endogenen Peroxidase zu erreichen. Nach dreimaligem Waschen in PBS (137mM NaCl, 27mM KCl, 83mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 5mM KH_2PO_4 ; pH 7.4) wurden die Schnitte 90 Minuten bei 37°C mit Chondroitinase ABC (from *Proteus vulgaris*, Fa. Sigma, Buchs, Schweiz; 2U/ml in 0.1M Tris-Puffer; pH 7.2) behandelt, um die Permeabilität der extrazellulären Matrix zu erhöhen. Zur Blockade unspezifischer Antigenbindungsstellen wurde nach erneutem Waschen in PBS mit 5% Ziegenerum (Fa. DAKO, Hamburg, Deutschland) 60 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem polyklonalem Rabbit-anti-Rat Antikörper gegen Tenascin C (freundlicherweise bereitgestellt von M. Chiquet, Maurice-Müller Institut, Bern; Konzentration 1:100, in TBS (50 mM Tris, 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl; pH 8,0) mit 1% BSA (albumin from bovine serum, Fa. Sigma, Buchs, Schweiz) und 0,1% Tween® (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)) bei Raumtemperatur für 60 Minuten. Von jedem Präparat wurden Kontrollen mit Präimmunserum des Spenderkaninchens (vor Immunisierung durch das Rattenanti-

gen) inkubiert (Präimmunserum freundlicherweise bereitgestellt von M. Chiquet, Maurice-Müller Institut, Bern, Schweiz; Konzentration 1:100, in TBS mit 1% BSA und 0,1% Tween®). Nach Waschen in TBS mit 0,1% Tween® wurden die Schnitte mit Peroxidase (horseradish peroxidase) konjugiertem Goat-anti-Rabbit IgG (freundlicherweise bereitgestellt von M. Chiquet, Maurice-Müller Institut, Bern, Schweiz; Konzentration 1:1000, in TBS mit 1% BSA und 0,1% Tween®) für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal in TBS mit 0,1% Tween® gewaschen. Das Antikörpersignal wurde mit 3-Amino-9-ethyl-Carbazol als Substrat für die Peroxidase sichtbar gemacht. Dazu wurde für circa 30 Minuten in 3-Amino-9-ethyl-Carbazol (AEC) gefärbt (1 Tablette Aminoethylcarbazol in 5ml Dimethylformamid gelöst; 10ml Imidazolpuffer (Fa. Fluka, Buchs, Schweiz) in 85ml H₂O; 20µl H₂O₂ als Starter). Die Färbung wurde mit Leitungswasser gestoppt. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur getrocknet und mit Aquatex® (Fa. VWR International, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

Chitinase-3-like Protein 1

Die entparaffinierten Schnitte wurden dem gleichen Procedere unterzogen (siehe Tenascin C, mit Blockade der endogenen Peroxidase, Erhöhung der Gewebspermeabilität mit Chondroitinase, Blockade unspezifischer Antigenbindungsstellen).

Es erfolgte die Inkubation mit einem polyklonalem Rabbit-anti-Rat Antikörper gegen das C-terminale Peptid KEAVALA des CHI3L1 (freundlicherweise bereitgestellt von A. Recklies, Joint Diseases Laboratory des Shriners Hospital, Montreal, Quebec, Kanada; Konzentration 1:100, in PBS mit 0,1% Tween®) bei 4°C über Nacht. Von jedem Präparat wurden Kontrollen mit Präimmunserum des Spenderkaninchens inkubiert (freundlicherweise bereitgestellt von A. Recklies, Joint Diseases Laboratory des Shriners Hospital, Montreal, Quebec, Kanada; Konzentration 1:100, in PBS mit 0,1% Tween®). Nach Waschen in PBS mit 0,1% Tween® wurden die Schnitte mit Peroxidase konjugiertem Goat-anti-Rabbit IgG (Fa. DAKO, Hamburg, Deutschland; Konzentration 1:1000, in PBS mit 0,1% Tween®) für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal in PBS mit 0,1% Tween® gewaschen. Das Antikörpersignal wurde ebenfalls mit 3-Amino-9-ethyl-Carbazol als Substrat für die Peroxidase sichtbar gemacht [vgl. Tenascin C]. Zuletzt wurde mit Mayers Hämalun (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt. Die Schnitte

wurden bei Raumtemperatur getrocknet und mit Aquatex® (Fa. VWR International, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

Col 2- $\frac{3}{4}$ m

Die Kryoschnitte wurden zunächst in PBS mit 0,1% Tween® für 15 Minuten rehydriert und anschließend dem gleichen Procedere wie die Paraffinschnitte unterzogen (siehe Tenascin C und Chitinase-3-like Protein 1).

Danach wurde mit einem monoklonalen Mouse-anti-Rat Antikörper gegen das Kollagenspaltprodukt Col 2- $\frac{3}{4}$ m (TECOmedical AG, Sissach, Schweiz; Konzentration 1:100, in PBS mit 0,1% Tween®) bei 4°C über Nacht inkubiert. Von jedem Präparat wurden Kontrollen ohne Applikation des ersten Antikörpers und ansonsten gleichem Procedere angefertigt. Nach Waschen in PBS mit 0,1% Tween® wurden die Schnitte mit Peroxidase konjugiertem Horse-anti-Mouse IgG (Vector Laboratories, Burlingame, USA) für 30 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Das Antikörpersignal wurde auch hier mit 3-Amino-9-ethyl-Carbazol als Substrat für die Peroxidase sichtbar gemacht. Zuletzt wurde mit Mayers Hämalaun (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur getrocknet und mit Aquatex® (Fa. VWR International, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

3.2.6. Auswertung der Immunhistochemie

Die Auswertung erfolgte an dem Lichtmikroskop Axioskop 40 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

Tenascin C

Um das Vorkommen von Tenascin C im Gelenkknorpel des Rattenhüftgelenks nach Stoßwellenbehandlung nachzuweisen, wurden insgesamt 40 Präparate getestet (je 20 linke und rechte Hüften). Von jedem Präparat wurden zwei immunhistologische Färbungen angefertigt und beurteilt. Die Auswertung der Präparate erfolgte anhand der Intensität der perizellulären immunhistologischen Färbung. Dazu wurde jedes Präparat nach einem einheitlichen Schema verblindet beurteilt:

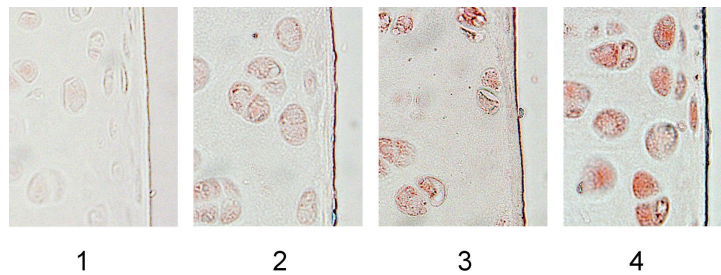


Abbildung 3.4: Einstufung des Antikörpersignals für Tenascin C von 1 bis 4 (Vergrößerung 20x)

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Wilcoxon Signed Ranks Test, wobei jeweils innerhalb einer Gruppe die Mittelwerte der linken und rechten Seite verglichen wurden. Zum Vergleich der Gruppen untereinander wurde der MannWhitney U Test angewandt, wobei ebenfalls die Mittelwerte der einzelnen Präparate herangezogen wurden und jeweils die Präparate der linken und rechten Seite untereinander verglichen wurden. Die Berechnungen wurden mit der Statistik-Software SPSS der Firma SPSS Inc. (München, Deutschland) durchgeführt. Statistische Signifikanz lag bei einem Wert von $p < 0,05$ vor.

Chitinase-3-like Protein 1

Von jedem Hüftkopf wurde eine immunhistologische Färbung mit einem polyklonalen Antikörper gegen CHI3L1 angefertigt. Es wurde verblindet beurteilt, ob sich ein Antikörpersignal im Zytoplasma der Chondrozyten nachweisen ließ:

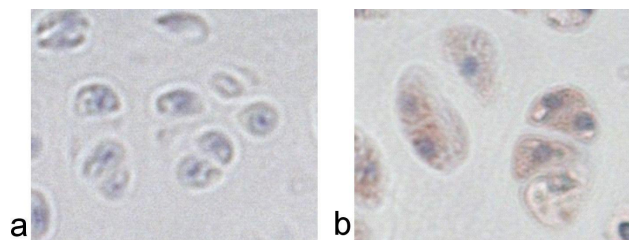


Abbildung 3.5: Beurteilung des CHI3L1 Antikörpersignals; **a**: kein Signal, **b**: Signal im Zytoplasma der Chondrozyten (Vergrößerung 40x)

Col 2- $\frac{3}{4}$ m

Von jedem Hüftkopf wurde eine Immunhistochemie mit einem monoklonalen Antikörper gegen Col 2- $\frac{3}{4}$ m angefertigt. Das Vorkommen eines Signals für das Kollagenspaltprodukt Col 2- $\frac{3}{4}$ m im perizellulären Raum und innerhalb der extrazellulären Matrix wurde verblindet beurteilt:

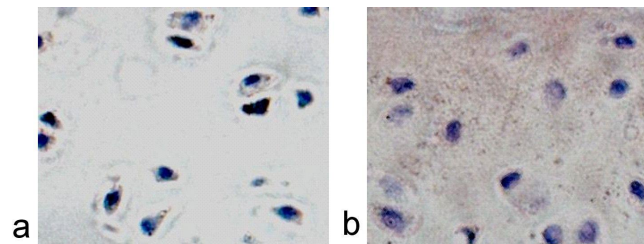


Abbildung 3.6: Beurteilung des Col 2- $\frac{3}{4}$ m Antikörpersignals; **a**: kein Signal, **b**: Signal innerhalb der extrazellulären Matrix in der Nähe der Chondrozyten (Vergrößerung 20x)

4. Ergebnisse

4.1. Stoßwellenbehandlung

Bei allen Versuchstieren traten bereits während der Stoßwellenbehandlung petechiale Hauteinblutungen und intrakutane Hämatome im Behandlungsgebiet auf. Diese erschienen in geringerem Ausmaß auch außerhalb des Fokusbereichs auf der behandelten Seite. Des Weiteren waren bei allen Tieren oberflächliche Hautverletzungen zu beobachten. Die Hälfte der mit Stoßwellen behandelten Tiere setzte einmalig unmittelbar nach der Behandlung blutigen Kot ab. Drei der 18 behandelten Tiere zeigten nach Stoßwellenapplikation ein Schonhinken des rechten Beines, das 30 Minuten nach Beendigung der Behandlung nicht mehr beobachtet werden konnte.

Einen Tag nach der ersten Stoßwellenapplikation verstarb eines der Tiere aus Gruppe I. Bei der Obduktion zeigte sich intraperitoneal frisches Blut, sodass davon auszugehen ist, dass durch die Stoßwellenbehandlung Bauchorgane verletzt wurden. Dieses Tier wurde aus der Auswertung herausgenommen.

Bei der Sektion der Tiere aus Gruppe I eine Woche nach Stoßwellenapplikation waren bei allen Tieren intramuskuläre Hämatome im Bereich der Glutealmuskulatur erkennbar. Vier Wochen nach Stoßwellenapplikation waren diese Hämatome bei einem Teil der Tiere aus Gruppe II noch residuell vorhanden. Die Sektion der Tiere aus Gruppe III zehn Wochen nach Stoßwellenbehandlung ergab keine makroskopisch erkennbaren pathologischen Befunde.

4.2. Kontaktradiografie

Bei keinem der Tiere kam es durch die Stoßwellenapplikation zu radiologisch nachweisbaren Verletzungen knöcherner Strukturen. Des Weiteren konnten auch keine Knochenveränderungen wie Osteophyten, Gelenkspaltverschmälerung oder subchondrale Sklerose beobachtet werden.

Die Ergebnisse der Messung der Hüftkopfabstände sind Tabelle 4.1 zu entnehmen.

Tabelle 4.1: Ergebnisse der Messung der Hüftkopfabstände

n	Mittelwert	Minimum	Maximum	SA
19	2,2 cm	2,1 cm	2,4 cm	0,10541 cm

SA=Standardabweichung

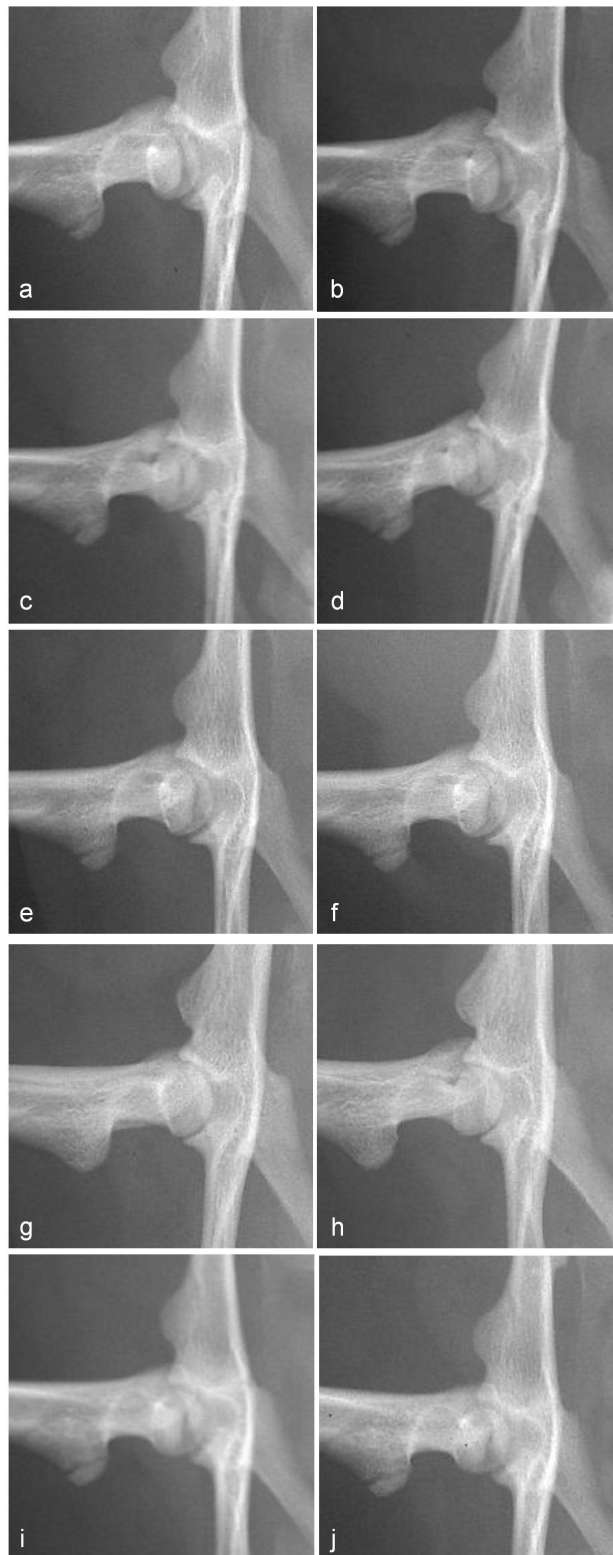


Abbildung 4.1: Kontaktradiografien des rechten Hüftgelenks vor und nach Stoßwellenapplikation;
a: Bild aus Gruppe I vor Stoßwellenbehandlung, b: gleiches Tier einen Tag nach Stoßwellen-
behandlung, c: Bild aus Gruppe II vor Stoßwellenbehandlung, d: gleiches Tier einen Tag nach
Stoßwellenbehandlung, e: Bild aus Gruppe III vor Stoßwellenbehandlung, f: gleiches Tier einen Tag
nach Stoßwellenbehandlung, g+h: Bilder aus Gruppe III zehn Wochen nach Stoßwellenbehandlung,
i+j: Bilder aus Kontrollgruppe

4.3. Histologie

Die HE-Färbung ließ keine pathologischen Veränderungen erkennen.

Die Ergebnisse der Auswertung der Safranin-O Färbung anhand der Mankin-Kriterien können Tabelle 4.2 entnommen werden. Die Befunde sind des Weiteren in Abbildung 4.2 dargestellt.

Tabelle 4.2: Ergebnisse der Auswertung der Safranin-O Färbung anhand des Mankin-Gradings

	Gruppe I						Gruppe II						Gruppe III						Ko.		
Knorpelstruktur																					
Unbehandelte Hüfte	0	0	0	0	0	*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Behandelte Hüfte	0	0	0	0	0	*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Zellgehalt																					
Unbehandelte Hüfte	0	0	0	0	0	*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Behandelte Hüfte	0	0	0	0	0	*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Safranin-O Färbung																					
Unbehandelte Hüfte	0	0	0	0	0	*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Behandelte Hüfte	0	0	0	1	0	*	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Integrität der Tidemark																					
Unbehandelte Hüfte	0	0	0	0	0	*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Behandelte Hüfte	0	0	0	0	0	*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Insgesamt																					
Unbehandelte Hüfte	0	0	0	0	0	*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Behandelte Hüfte	0	0	0	1	0	*	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

* verstorbenes Tier, das aus der Wertung genommen wurde

Ko. = Kontrollgruppe

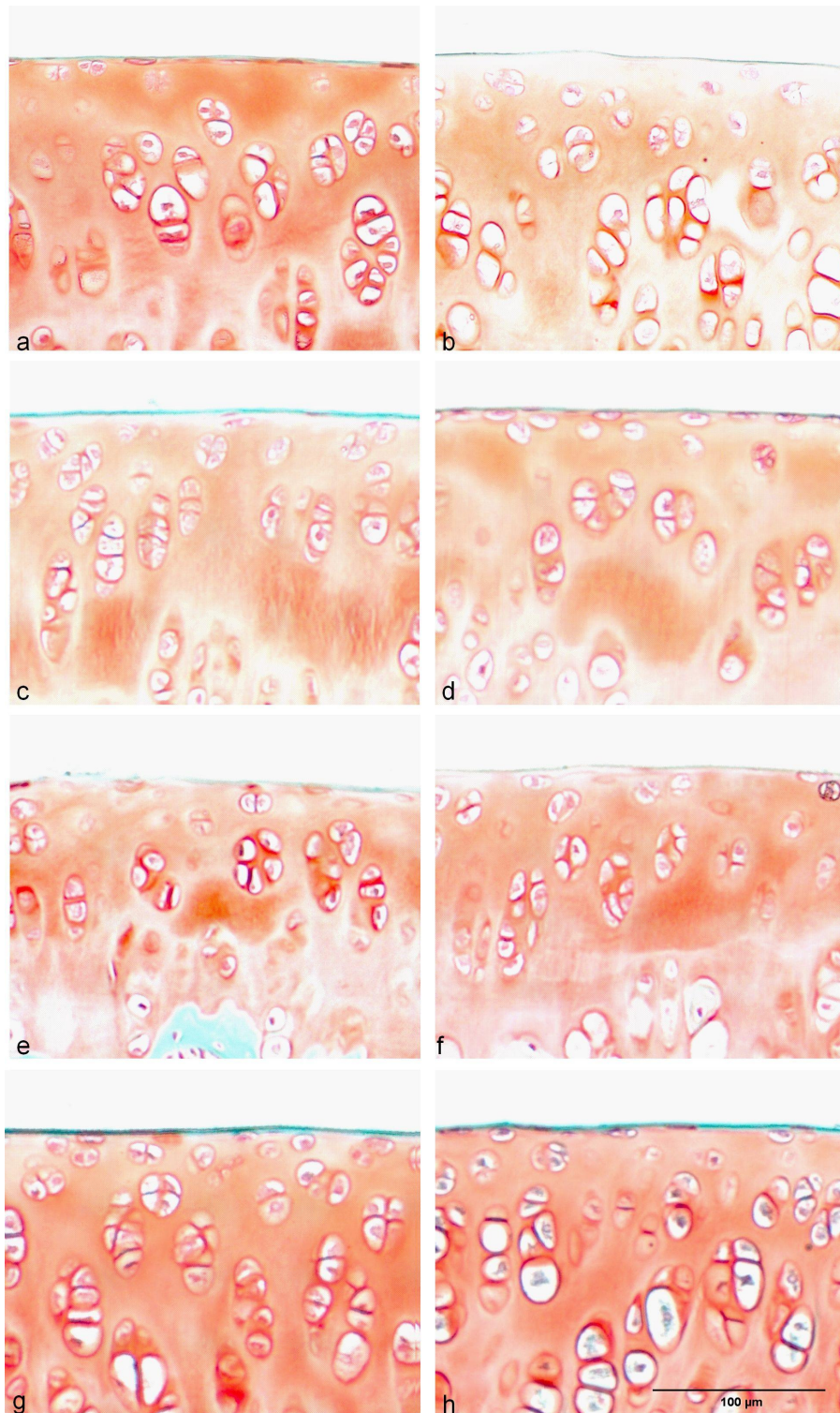


Abbildung 4.2: Safranin-O Färbung des Hüftgelenkknorpels;

a: Präparat aus Gruppe I, unbehandeltes Hüftgelenk, **b:** Präparat der behandelten Hüfte des gleichen Tieres, **c:** Präparat aus Gruppe II, unbehandeltes Hüftgelenk, **d:** Präparat der behandelten Hüfte des gleichen Tieres, **e:** Präparat aus Gruppe III, unbehandeltes Hüftgelenk, **f:** Präparat der behandelten Hüfte des gleichen Tieres, **g+h:** Präparate aus der Kontrollgruppe (Vergrößerung 20x)

4.4. Immunhistochemie

Tenascin C

Tabelle 4.3: Einzelwerte der Immunhistochemie mit Tenascin C (dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus zwei Färbungen)

Gruppe I		Gruppe II		Gruppe III		Kontrollgruppe
Unbehandelte Hüfte	Behandelte Hüfte	Unbehandelte Hüfte	Behandelte Hüfte	Unbehandelte Hüfte	Behandelte Hüfte	Unbehandelte Hüfte
1	2	1	2	2	4	1
1	1	1	3,5	2,5	3	1
1	2,5	1,5	3	2	3	1
1	2	0,5	1,5	3	3,5	2
2,5	1	0,5	2	2	3,5	
*	*	1,5	1,5	3,5	3,5	

* verstorbenes Tier, das aus der Wertung genommen wurde

Folgende Beobachtungen lassen sich anhand von Tabelle 4.3 nachvollziehen:

- zum einen ein stärkeres Signal für Tenascin C am behandelten Hüftgelenk im Vergleich zum unbehandelten in den einzelnen Gruppen. Dieser Unterschied war in Gruppe I aufgrund der kleinen Fallzahl (n=5) nicht statistisch signifikant ($p=0,577$). In Gruppe II und III dagegen war der Unterschied zwischen behandelter und unbehandelter Seite statistisch signifikant ($p=0,041$ und $p=0,042$).
- zum anderen eine Zunahme des Antikörpersignals im Zeitverlauf. Gruppe I und II unterschieden sich nicht statistisch signifikant ($p=0,662$ für die unbehandelte und $p=0,429$ für die behandelte Seite). Die Zunahme des Antikörpersignals zwischen Gruppe I und III ($p=0,030$ für die unbehandelte und $p=0,004$ für die behandelte Seite) und zwischen Gruppe II und III ($p=0,002$ für die unbehandelte und $p=0,026$ für die behandelte Seite) war statistisch signifikant.

Abbildung 4.3 bis Abbildung 4.6 geben die oben beschriebenen Befunde wider. Das Signal für Tenascin C innerhalb der extrazellulären Matrix unterscheidet sich zwischen behandeltem und unbehandeltem Hüftgelenk und Kontrolltieren unwesentlich. Auffallend sind jedoch die Unterschiede des perizellulären Signals zwischen behandeltem und unbehandeltem Hüfte. Dieses Signal ist im Zeitverlauf (Gruppe I – III) auf beiden Seiten zunehmend. Die Intensität des Antikörpersignals ist in allen Schichten (oberflächliche, mittlere und tiefe) des Gelenkknorpels gleich ausgeprägt.

Die statistischen Daten sind Tabelle 4.4 und Tabelle 4.5 zu entnehmen. Aufgrund der kleinen Fallzahl (n=2) in der Kontrollgruppe wurde mit dieser keine statistische Auswertung durchgeführt.

Tabelle 4.4: Ergebnisse der statistischen Auswertung mit dem Wilcoxon Signed Ranks Test

	Mittelwert	Minimum	Maximum	SA	p
Gruppe I (n=5)					
Unbehandeltes Hüftgelenk	1,3	1,0	2,5	0,67082	0,577
Behandeltes Hüftgelenk	1,7	1,0	2,5	0,67082	
Gruppe II (n=6)					
Unbehandeltes Hüftgelenk	1,0	0,5	1,5	0,44721	0,041
Behandeltes Hüftgelenk	2,25	1,5	3,5	0,82158	
Gruppe III (n=6)					
Unbehandeltes Hüftgelenk	2,5	2,0	3,5	0,63246	0,042
Behandeltes Hüftgelenk	3,4	3,0	4,0	0,37639	

SA=Standardabweichung

Tabelle 4.5: Ergebnisse der statistischen Auswertung mit dem MannWhitney U Test

Verglichene Gruppen	p	
	Unbehandelte Hüfte	Behandelte Hüfte
Gruppe I&II	0,662	0,429
Gruppe I&III	0,030	0,004
Gruppe II&III	0,002	0,026

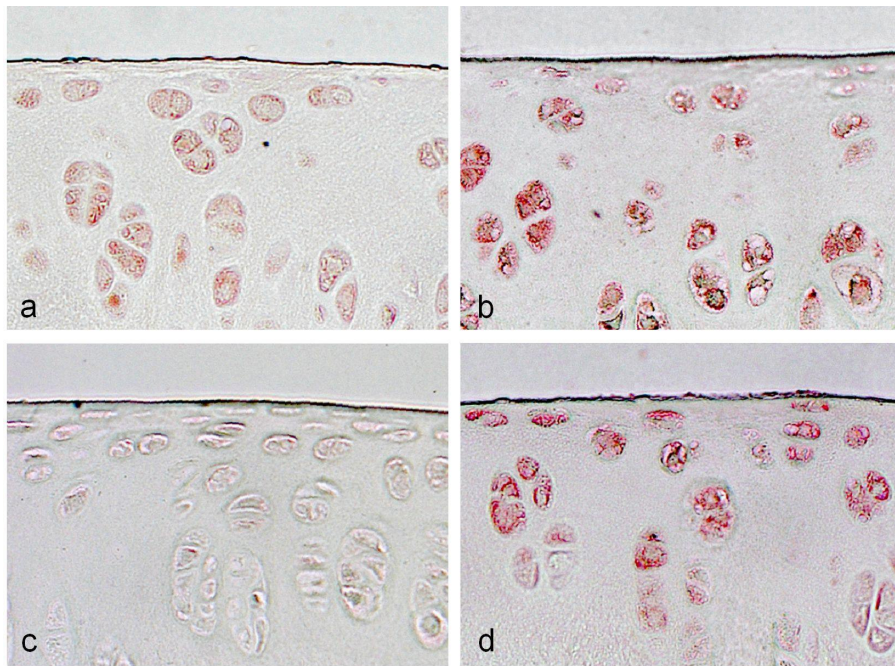


Abbildung 4.3: Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Tenascin C;
a+c: Präparate der unbehandelten Hüfte aus Gruppe I, **b+d**: jeweils Präparate der behandelten Hüfte
des gleichen Tieres (Vergrößerung 20x)

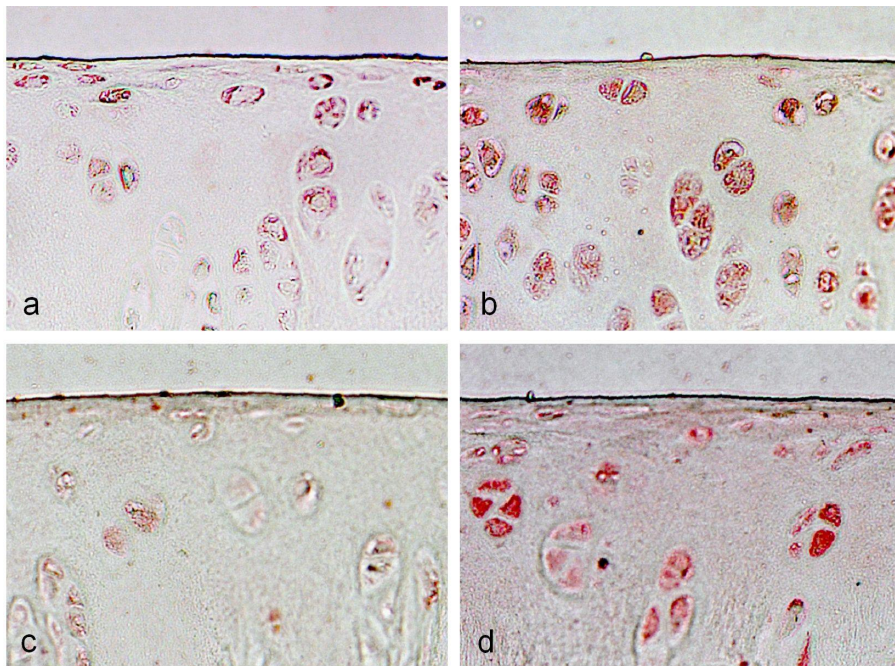


Abbildung 4.4: Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Tenascin C;
a+c: Präparate der unbehandelten Hüfte aus Gruppe II, **b+d**: jeweils Präparate der behandelten Hüfte
des gleichen Tieres (Vergrößerung 20x)

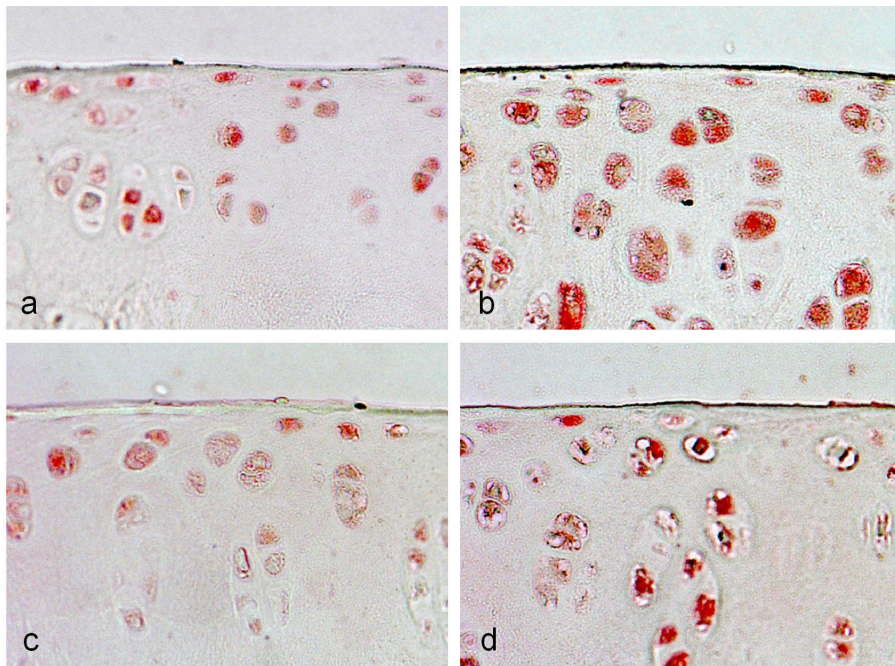


Abbildung 4.5: Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Tenascin C;
a+c: Präparate der unbehandelten Hüfte aus Gruppe III, **b+d**: jeweils Präparate der behandelten Hüfte
des gleichen Tieres (Vergrößerung 20x)

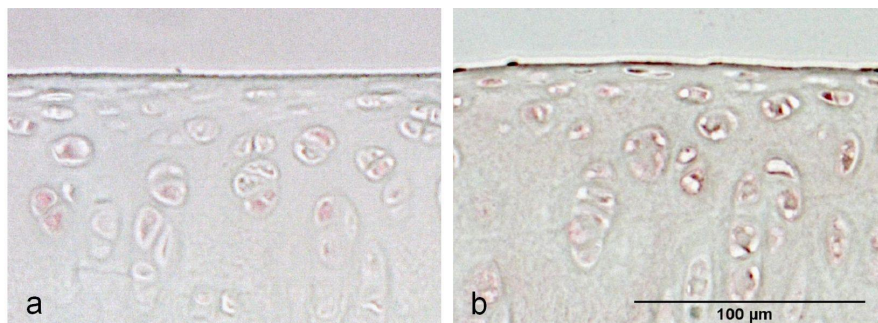


Abbildung 4.6: Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Tenascin C;
a+b: Präparate aus Kontrollgruppe (Vergrößerung 20x)

Chitinase-3-like Protein 1

In Gruppe I und II ließ sich bei keinem der Präparate ein Antikörpersignal für CHI3L1 nachweisen [vgl. Abbildung 4.7 a+b]. Ebenso zeigte die Kontrollgruppe (Gruppe IV) keine Anfärbung [vgl. Abbildung 4.7 e+f]. In Gruppe III wiesen alle Präparate sowohl am behandelten als auch am unbehandelten Hüftgelenk ein intrazelluläres Signal für CHI3L1 auf [vgl. Abbildung 4.7 c+d].

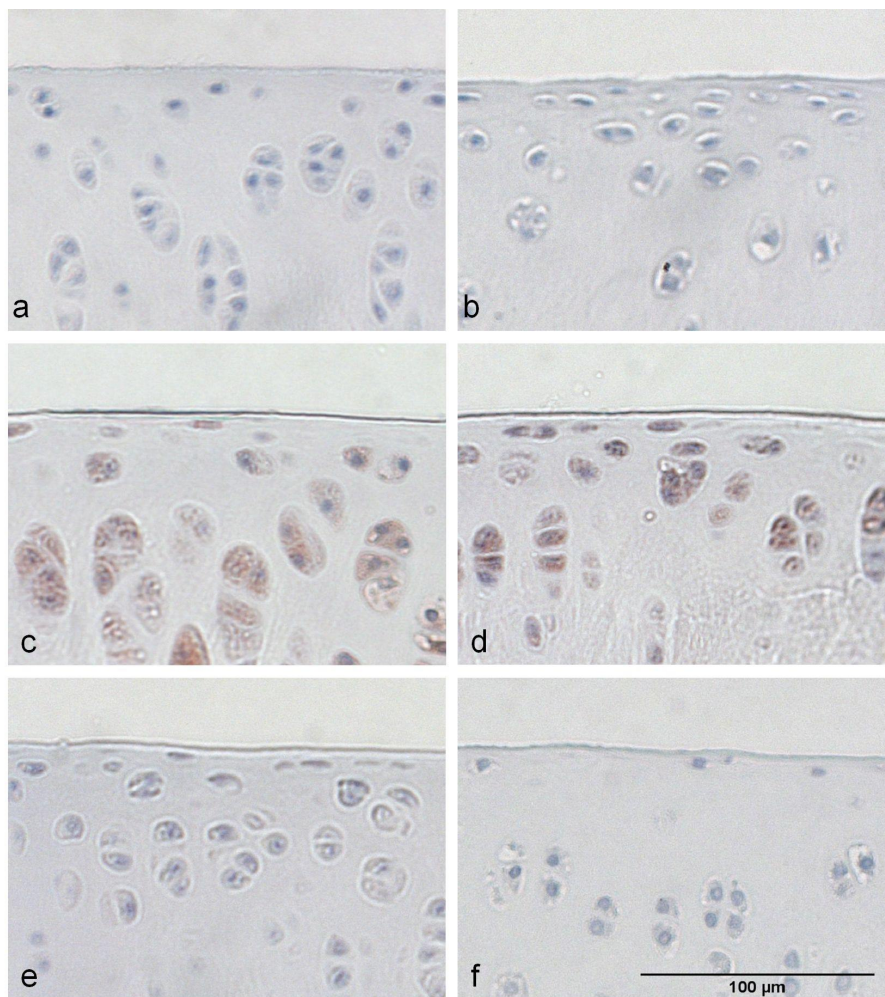


Abbildung 4.7: Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen CHI3L1;
a: Präparat aus Gruppe I, **b:** Präparat aus Gruppe II, **a+b:** kein Antikörpersignal, **c+d:** Präparate aus Gruppe III, Signal im Zytoplasma der Chondrozyten, **e+f:** Präparate aus der Kontrollgruppe ohne Signal (Vergrößerung 20x, Kernfärbung mit Hämalaun)

Col 2- $\frac{3}{4}$ m

Die Präparate aus Gruppe I und II zeigten kein Signal für Col 2- $\frac{3}{4}$ m. In Gruppe III war in jeweils zwei Präparaten ein diskretes Antikörpersignal für Col 2- $\frac{3}{4}$ m sowohl am unbehandelten als auch am behandelten Hüftgelenk erkennbar. In der Kontrollgruppe ließ sich Col 2- $\frac{3}{4}$ m nicht nachweisen.

In Bereichen, in denen die Haftung der Kryoschnitte am Objektträger ungenügend war, war ein geringes, unspezifisches Signal erkennbar, das nicht als Antikörpersignal gewertet wurde.

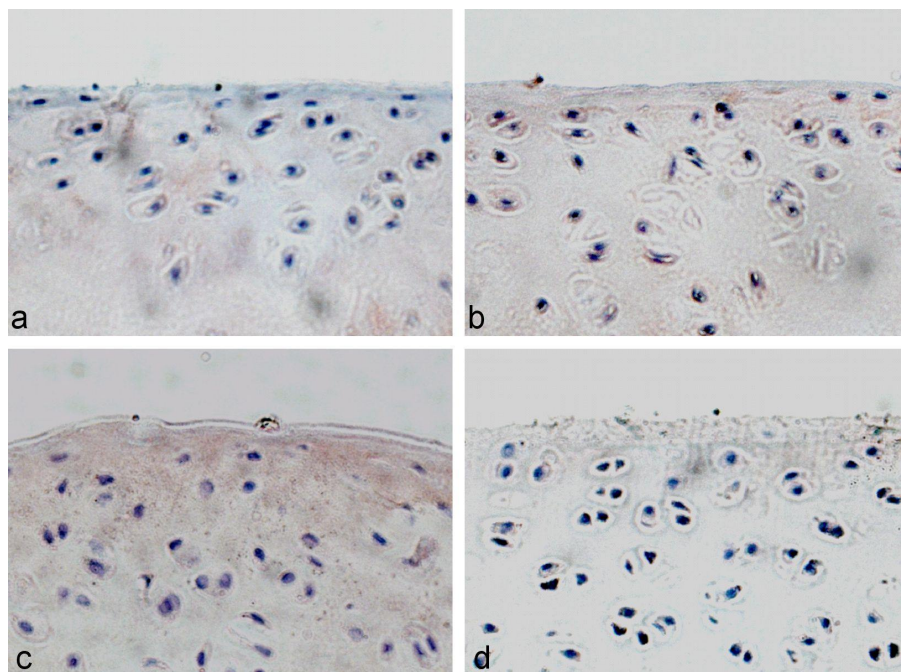


Abbildung 4.8: Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Col 2- $\frac{3}{4}$ m;
a: Präparat aus Gruppe I, **b:** Präparat aus Gruppe II, **a+b:** kein Antikörpersignal, **c:** Präparat aus Gruppe III mit Antikörpersignal in der interterritorialen Matrix, **d:** Präparat aus der Kontrollgruppe ohne Signal (Vergrößerung 20x, Kernfärbung mit Hämalaun)

5. Diskussion

5.1. Diskussion der Methodik

Extrakorporale Stoßwellen werden als ergänzendes nicht-invasives Therapieverfahren bei der Behandlung zahlreicher orthopädischer Krankheitsbilder eingesetzt. Dabei kommen Stoßwellen einer Energieflussdichte ab $0,5 \text{ mJ/mm}^2$ insbesondere bei der Behandlung der Tendinosis calcarea (Hsu et al. 2008), der Hüftkopfnekrose (Wang et al. 2005) und der aseptischen Pseudarthrose (Schoellner et al. 2002) zur Anwendung. Bei der Therapie dieser Krankheitsbilder liegt der hyaline Gelenkknorpel häufig im Gebiet der Stoßwellenapplikation. Ob Stoßwellen eine Veränderung der molekularen Zusammensetzung des Gelenkknorpels bewirken, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. *In vitro* Untersuchungen ergaben so unterschiedliche Ergebnisse wie eine Schädigung von Chondrozyten (Byron et al. 2005), eine Verminderung der Glykosaminoglykansynthese (Benson et al. 2007), eine Steigerung des Gentransfers (Murata et al. 2007) oder keinen Effekt (Renz and Rupp 2008) nach Anwendung extrakorporaler Stoßwellen. Diese zum Teil widersprüchlichen Befunde gaben Anlass, den Zusammenhang zwischen extrakorporaler Stoßwellentherapie und Zustand des Gelenkknorpels weiter zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Rattenmodell gewählt. Ratten eignen sich als Tiermodell durch die ausgeprägte genetische, anatomische und physiologische Ähnlichkeit zum Menschen und durch günstige Beschaffungs- und Haltungskosten (Appleton et al. 2007a; Lindblad-Toh 2004). Aus diesen Gründen ist das gewählte Modell in der Erforschung posttraumatischer Knorpelveränderungen etabliert, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Studien erleichtert (Appleton et al. 2007a; Appleton et al. 2007b; Bendele 2001).

Ein weiterer Vorteil des gewählten Modells liegt darin, dass Ratten kaum spontane degenerative Veränderungen des Gelenkknorpels zeigen. Vor allem der Knorpel von Tieren, die jünger als sechs Monate sind, gilt als degenerationsfrei (Gyarmati et al. 1987; Oda et al. 2007; Smale et al. 1995). Da die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiere am Endpunkt maximal fünfeinhalb Monate alt waren, sind die nach Stoßwellenbehandlung nachweisbaren Veränderungen nicht auf eine spontane und altersbedingte Knorpeldegeneration zurückzuführen.

Posttraumatische Knorpelveränderungen können mit histologischen Methoden nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde mit der Safranin-O Färbung in Kombination mit Fast Green die am häufigsten verwendete Färbemethode zur Darstellung der Glykosaminoglykane und Proteoglykane des Knorpels gewählt (Hyllested et al. 2002). Die Färbung mit Safranin-O verhält sich stöchiometrisch zum Glykosaminoglykan- und Proteoglykangehalt der extrazellulären Matrix des Gelenkknorpels (Rosenberg 1971). Mankin et al. entwickelten ein histopathologisches Gradingssystem, das eine Beurteilung des Gelenkknorpels bezüglich Struktur, Zellgehalt, Färbung der Matrix und Integrität der Tidemark auf der Basis dieses Zusammenhangs erlaubt (Mankin et al. 1971). Mit diesem System können somit posttraumatische Knorpelveränderungen erfasst werden, weshalb es in der vorliegenden Arbeit zur histologischen Evaluation des Gelenkknorpels nach Stoßwellenbehandlung herangezogen wurde.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass in der Literatur bisher nicht abschließend geklärt werden konnte, ob der stöchiometrische Zusammenhang zwischen Safranin-O Färbung und Proteoglykangehalt des Gelenkknorpels auch in Kombination mit Fast Green gültig ist. Mehrere Studien wiesen jedoch auf eine gute Korrelation zwischen Glykosaminoglykan- beziehungsweise Proteoglykangehalt und Safranin-O Färbung hin, was die Validität des Mankin-Gradings betont (Jubb and Eggert 1981; Kiviranta et al. 1985; Kiraly et al. 1996).

Der Vorteil des Gradingystems nach Mankin liegt in der guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (van der Sluijs et al. 1992). Als Nachteil ist jedoch eine Ungenauigkeit der Ergebnisse insofern festzustellen, dass keine Unterscheidung zwischen leichten und mäßigen Knorpelveränderungen gemacht werden kann (Ostergaard et al. 1999). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich immunhistochemische Methoden eingesetzt, die einen Nachweis sehr früher posttraumatischer Veränderungen ermöglichen.

Immunhistochemische Verfahren zeichnen sich neben einer guten Reproduzierbarkeit durch hohe Sensitivität und Spezifität für das jeweils zu untersuchende Molekül aus. Eine quantitative Evaluation ist mit dieser Methode jedoch nicht adäquat möglich (Veje et al. 2003).

Um frühe posttraumatische Umbauvorgänge im Gelenkknorpel nach Stoßwellenbehandlung nachweisen zu können, wurden drei verschiedene immunhistochemisch

nachweisbare Marker gewählt: Tenascin C, CHI3L1 und Col 2-³/₄m. Die Funktion und das Vorkommen dieser Marker werden im Folgenden skizziert.

Tenascin C

Tenascin C ist ein extrazelluläres Glykoprotein, das während der Embryogenese am Knochen- und Knorpelwachstum beteiligt ist und in normalen Geweben des Erwachsenen kaum vorkommt. Während Heilungsprozessen und im Stroma maligner Neoplasien konnte eine vermehrte Produktion von Tenascin C nachgewiesen werden (Chiquet-Ehrismann et al. 1986; Koukoulis et al. 1991).

In gesundem, humanem Gelenkknorpel ist Tenascin C immunhistochemisch nur in der oberflächlichen Zone nachweisbar. Im Knorpel von Patienten mit rheumatoider Arthritis oder Arthrose kommt Tenascin C jedoch vermehrt vor, wobei die Zunahme am stärksten in der oberflächlichen Zone zu sehen ist (Salter 1993; Chevalier et al. 1994). Veje et al. zeigten, dass die Aufregulation bereits in frühen arthrotischen Stadien im Bereich der oberflächlichen Schicht beginnt und im Verlauf weiter zunimmt und sich auf tiefere Knorpelschichten ausdehnt (Veje et al. 2003). Zu Beginn degenerativer Umbauvorgänge kommt es vor allem in der oberflächlichen Zone zur gesteigerten Kollagenspaltung in der Nähe der Chondrozyten. Veje et al. sehen darin den Zusammenhang für das vermehrte Vorkommen von Tenascin C in der obersten Schicht im Sinne eines Gegenregulationsmechanismus.

Tenascin C konnte nicht nur im Rahmen der idiopathischen Arthrose beim Menschen sondern auch im Rahmen chirurgisch induzierter posttraumatischer Veränderungen der Gelenkknorpels im Tiermodell nachgewiesen werden (Pfander et al. 1999). Während Tenascin C in normalem Kaninchenknorpel nur in tieferen Schichten vorkommt, wurde die gesteigerte Expression bei der posttraumatischen Arthrose vor allem in der oberflächlichen Zone festgestellt.

Auch bei Ratten konnte Tenascin C im Gelenkknorpel nachgewiesen werden. Mackie et al. beobachteten ein geringes Vorkommen von Tenascin C in der oberflächlichen Gelenkknorpelzone bei vier Wochen alten Ratten. Zehn Wochen alte Tiere zeigten dagegen kein Signal für Tenascin C (Mackie and Ramsey 1996). Die sowohl von Mackie et al. als auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sprague-Dawley Ratten gelten ab einem Alter von zehn Wochen als ausgewachsen. Die Studie von Mackie et al. zeigt also, dass Tenascin C bei sehr jungen Ratten nachweisbar ist und

im Verlauf des Wachstums wieder verschwindet. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen ein geringes Vorkommen von Tenascin C bei den Tieren der Kontrollgruppe nachgewiesen, die zum Zeitpunkt der Untersuchung 14 bis 16 Wochen alt und somit ausgewachsen waren [vgl. Abbildung 4.6]. Wie beim Menschen ist daher wahrscheinlich auch bei der Ratte ein geringes Vorkommen von Tenascin C in adultem Gelenkknorpel physiologisch (Salter 1993; Chevalier et al. 1994).

Wichtig ist aber, dass ein deutlicher Unterschied zwischen dem Signal für Tenascin C in der Kontrollgruppe im Vergleich zu allen mit Stoßwellen behandelten Tieren bestand. Diese erneute Aufregulation von Tenascin C bei erwachsenen Tieren ist somit im Zusammenhang posttraumatischer Veränderungen nach Stoßwellenbehandlung zu sehen.

In vitro fördert Tenascin C die Chondrogenese (Mackie et al. 1987) und wirkt der Fibronectin-vermittelten Hemmung der Synthese extrazellulärer Matrixproteine entgegen (West et al. 1979). Möglicherweise spielt Tenascin C in geschädigtem Knorpel eine ähnliche Rolle, indem es die Zelladhäsion an Fibronectin modifiziert (Chiquet-Ehrismann et al. 1995). Als Schlussfolgerung kann Tenascin C als protektiver Faktor betrachtet werden, der den Abbauvorgängen im Rahmen der posttraumatischen oder degenerativen Knorpelschädigung entgegenwirkt. Da es bereits im Rahmen sehr früher Veränderungen vermehrt nachweisbar ist, wurde die Immunhistochemie mit Tenascin C in dieser Arbeit zur Detektion solcher Veränderungen nach Stoßwellenbehandlung gewählt.

Chitinase-3-like Protein 1

Als zweiter Marker für mögliche Knorpelschäden wurde Chitinase-3-like Protein 1 (CHI3L1; synonym YKL40) eingesetzt, das ursprünglich als Sekretionsprodukt von Chondrozyten und Synovialzellen in Zellkultur entdeckt und der Familie der Chitinasen zugeordnet wurde (Hakala et al. 1993). Vor allem in Geweben, die starken Umbauvorgängen unterliegen, konnte eine vermehrte Expression des Glykoproteins nachgewiesen werden (Connor et al. 2000). Erhöhte Serumspiegel von CHI3L1 finden sich beispielsweise bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und Arthrose (Harvey et al. 1998). Des Weiteren weist arthrotisch veränderter Knorpel erhöhte CHI3L1 mRNA-Spiegel auf. Gesunder Knorpel zeigt hingegen kein Vorkommen von CHI3L1 (Connor et al. 2000; Volck et al. 1999). Allerdings existieren auch Studien mit

humanen Knorpelpräparaten, die keine Aufregulation von CHI3L1 im Rahmen der Arthrose nachweisen konnten (Steck et al. 2002).

In verschiedenen Studien wurde am Tiermodell gezeigt, dass CHI3L1 bei posttraumatischen Knorpelveränderungen vermehrt exprimiert wird. An Hunden mit vorderer Kreuzbandtransektion konnte eine gesteigerte Expression von CHI3L1 bereits nach sechs Wochen nachgewiesen werden. Diese Aufregulation blieb über den gesamten Untersuchungszeitraum (bis 48 Wochen) bestehen (Lorenz et al. 2005). Und auch bei Ratten, deren Kniegelenk mittels Fixateur interne immobilisiert wurde, kam es bereits nach zwei Wochen zur verstärkten Synthese von CHI3L1, die nach vier Wochen wieder zur normalen Sekretionsrate des gesunden Knorpels zurückkehrte (Trudel et al. 2007).

CHI3L1 nimmt eine protektive Rolle im Rahmen posttraumatischer oder degenerativer Knorpelveränderungen ein, indem es der durch Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-1 vermittelten Knorpeldegeneration entgegenwirkt. Es bewirkt dadurch unter anderem eine Verminderung der Sekretion knorpelverdauender Enzyme wie MMP-1, MMP-3 und MMP-13 (Ling and Recklies 2004). Des Weiteren gilt CHI3L1 als proliferationsstimulierender Wachstumsfaktor für Bindegewebe (Recklies et al. 2002).

Die wirkliche physiologische Funktion von CHI3L1 konnte zwar noch nicht festgelegt werden, aber ein gesteigertes Vorkommen im Rahmen posttraumatischer Umbauvorgänge des Gelenkknorpels wurde am Tiermodell nachgewiesen (Lorenz et al. 2005; Trudel et al. 2007). Aus diesem Grund wurde CHI3L1 zusätzlich zu Tenascin C als Marker früher Knorpelveränderungen eingesetzt.

Col 2- $\frac{3}{4}$ m

Schließlich wurde noch eine immunhistochemische Färbung mit dem Marker Col 2- $\frac{3}{4}$ m angefertigt. Dieser ist ein Spaltprodukt des Kollagens, das für die Zugfestigkeit des Gelenkknorpels verantwortlich ist. Die Zerstörung des Kollagennetzwerks spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Arthrose, da sie irreparable Schäden hinterlässt (Kempson et al. 1973). Den größten Anteil an Kollagen im Gelenkknorpel macht Kollagen-II mit 90-95% aus (Poole 2001). Dieses ist aus einer Tripelhelix aufgebaut, die aus drei identischen α -Ketten besteht. Im Rahmen der Arthrose kommt eine gesteigerte Spaltung (Billinghurst et al. 1997) und Denaturierung (Hollander et al. 1994) von Kollagen-II vor.

Zur intrahelikalen Spaltung der Kollagenmoleküle sind die Matrix-Metalloproteinasen 1, 8 und 13 fähig (Billinghurst et al. 1997). Diese spalten das Kollagenmolekül an einer einzigen Stelle (Gly⁷⁷⁵ - Leu/Ile⁷⁷⁶). Dabei entstehen jeweils ein 1/4- und ein 3/4-Teilstück der ursprünglichen α -Kette. Der Antikörper Col 2-3/4m reagiert mit einem Epitop auf dem 3/4-Teilstück, das nur zugänglich ist, wenn das Kollagenmolekül in denaturiertem Zustand vorliegt.

Ein geringer Anteil des Gesamtkollagens liegt auch in gesundem Knorpel in denaturierter Form vor (1,1%). Bei der Entstehung und im Verlauf einer Arthrose wurde jedoch eine deutliche Zunahme dieses Anteils nachgewiesen (Hollander et al. 1994). Dabei wurde festgestellt, dass die Denaturierung in der oberflächlichen Zone des Knorpels in der Nähe der Chondrozyten beginnt und sich später in tiefere Zonen ausbreitet (Hollander et al. 1995).

Auch im Rahmen posttraumatischer Veränderungen des Gelenkknorpels lassen sich vermehrt Kollagenspaltprodukte nachweisen. Dies konnte in einer Studie von Stoop et al. gezeigt werden, die das Vorkommen von Col 2-3/4m im Knorpel des Kniegelenks von Ratten nach vorderer Kreuzbanddurchtrennung untersuchten. Ähnlich dem Verlauf bei der menschlichen Arthrose kam es auch hier zur Zunahme des Signals im Zeitverlauf, wobei Col 2-3/4m erstmals zwei Wochen nach Kreuzbandtranssektion nachweisbar war (Stoop et al. 2000).

Der Antikörper gegen das Kollagenspaltprodukt Col 2-3/4m wurde in dieser Arbeit gewählt, da hierbei im Gegensatz zu den Antikörpern gegen Tenascin C und CHI3L1 ein direkter Nachweis einer Schädigung des Knorpels möglich ist. Zudem besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem Grad der Denaturierung, wie er sich in der Immunhistochemie darstellt, und den Ergebnissen quantitativer Verfahren wie dem Immunoassay und dem Mankin Grading System, was die Zuverlässigkeit dieses Markers erhöht (Hollander et al. 1995).

Zuletzt soll noch auf die in der vorliegenden Arbeit angewandte Präparationsmethode eingegangen werden. Die Hüftköpfe wurden vor Aufbereitung für die einzelnen Untersuchungen mit dem Meißel durchtrennt. Dieses Verfahren erscheint durch eine mögliche Traumatisierung des Gelenkknorpels zunächst ungünstig. Aus zwei Gründen ist jedoch keine artefizielle Verfälschung der Ergebnisse zu erwarten. Zum einen sind die histologisch und immunhistochemisch untersuchten Prozesse *in vivo* Veränderungen, die sich unmittelbar post mortem nicht mehr verändern. Zum

anderen wurde bei Anfertigung der Paraffinschnitte und bei der Auswahl der Knorpelproben für die Kryoschnitte ein ausreichender Abstand zur Kante des durchtrennten Hüftkopfes eingehalten.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

Die in dieser Studie festgestellten lokalen Nebenwirkungen der extrakorporalen Stoßwellenapplikation wie Schmerzen, Hauterosionen, petechiale Hautblutungen und Hämatome decken sich mit den in der Literatur beschriebenen Befunden (Haake et al. 2002). Zusätzlich dazu kam es in dieser Studie bei einem Tier zur Verletzung des Darms. Die Applikation von Stoßwellen an luftgefüllten Organen stellt aufgrund der physikalischen Eigenschaften der Stoßwellen eine Kontraindikation dar (Sistermann und Katthagen 1998). Daher wird bei der Stoßwellentherapie beim Menschen immer ein ausreichender Abstand zu luftgefüllten Organen wie dem Darm eingehalten. Aufgrund der anatomischen Nähe des Darms der Ratte zum Hüftgelenk ließ sich jedoch die Verletzung auch bei exakter Fokussierung der Stoßwellen nicht vermeiden.

Zum Zeitpunkt der Literaturrecherche lag nur eine Studie vor, in der die Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf Gelenkknorpel ebenfalls *in vivo* untersucht wurde (Vaterlein et al. 2000). Hierbei wurden die Femurkondylen von Kaninchen nach Applikation von 2000 Impulsen von Stoßwellen der EFD $1,2 \text{ mJ/mm}^2$ an unterschiedlichen Zeitpunkten bis zu 24 Wochen nach Behandlung makroskopisch, histologisch und radiologisch ausgewertet. Radiologisch wurde keine Pathologie des Knochens im Sinne einer Fraktur oder im Sinne degenerativer Veränderungen festgestellt. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten keine röntgenologischen Veränderungen des Knochens nach Stoßwellenbehandlung nachgewiesen werden.

Des Weiteren konnten Vaterlein et al. bei der makroskopischen und histologischen Evaluation der Kaninchenpräparate keine pathologischen Befunde feststellen. Es kam also zu keinen mit den verwendeten Methoden nachweisbaren Umbauvorgängen. Für die histologische Beurteilung des Knorpels wählten Vaterlein et al. eine Toluidinblaufärbung. Diese färbt ähnlich der Safranin-O Färbung Glykosaminoglykane und Proteoglykane. Es wurde jedoch gezeigt, dass Toluidinblau zur Beurteilung des Gelenkknorpels gegenüber der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Safranin-O Färbung unterlegen ist, da der stöchiometrische Zusammenhang zwischen Proteoglykangehalt und Intensität der Färbung ungenauer ist (Poole 1970; Hyllested et al. 2002). Da histologische Verfahren für die Detektion sehr früher Veränderungen ungeeignet sind, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die

Immunhistochemie eingesetzt. Dies sollte auch beim Entwurf zukünftiger Studien beachtet werden.

Kaninchen gelten ab einem Alter von 180 Tagen als ausgewachsen. Die in der Studie von Vaterlein et al. gewählten Kaninchen waren zum Zeitpunkt der Stoßwellenbehandlung 100 Tage alt und damit nicht ausgewachsen. Da der Knorpel im Wachstumsalter über ausgeprägtere Regenerationsmöglichkeiten als reifer Gelenkknorpel verfügt, sind durch die Studie von Vaterlein et al. posttraumatische Veränderungen nach Stoßwellenbehandlung nicht endgültig auszuschließen.

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Sprague-Dawley Ratten waren zwischen zehn und zwölf Wochen alt und somit adult. Daher ist bei diesen Tieren von keiner besonderen Regenerationsfähigkeit des Gelenkknorpels auszugehen. Dies ist insofern wichtig, dass die extrakorporale Stoßwellentherapie in der Klinik normalerweise nur beim Erwachsenen angewendet wird und deshalb eine größere Ähnlichkeit zwischen Tierexperiment und Klinik besteht. Auch in zukünftigen Studien sollte die Untersuchung von pathogenetischen Zusammenhängen an ausgewachsenen Tieren erfolgen, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine gesteigerte Regeneration im Wachstumsalter zu vermeiden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Knorpelpräparate nach extrakorporaler Stoßwellenapplikation mittels histologischer und immunhistochemischer Methoden untersucht. Die histologische Evaluation der Präparate ergab keine pathologischen Befunde. Die leichte Verminderung des Proteoglykangehalts in der Safranin-O Färbung in wenigen Präparaten stellt wahrscheinlich ein Artefakt dar. Dafür spricht zum einen, dass Struktur und Zellen des Knorpels unverändert sind und zum anderen, dass ein Proteoglykanverlust nicht im Rahmen sehr früher posttraumatischer Knorpelveränderungen auftritt. Zudem bestand keine Korrelation zwischen dem Vorkommen des Kollagenspaltprodukts Col 2- $\frac{3}{4}$ m und verminderter Safranin-O Färbung, wie es üblicherweise der Fall ist (Hollander et al. 1995).

Im Folgenden werden die verschiedenen Ergebnisse der Immunhistochemie zusammengefasst dargestellt und anschließend gemeinsam diskutiert.

- Das Signal für Tenascin C war in allen Gruppen am behandelten Hüftgelenk stärker ausgeprägt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten die Gruppe I bis III eine größere Intensität der Färbung, wobei diese Intensität im Zeitverlauf zunahm.

- Chitinase-3-like Protein 1 war nur in Gruppe III sowohl am behandelten als auch am unbehandelten Hüftgelenk nachweisbar.
- Col 2- α 1 kam vereinzelt in Präparaten sowohl des behandelten als auch des unbehandelten Hüftgelenks in Gruppe III vor.

Anhand dieser Befunde kann die in der Einleitung formulierte Hypothese, dass Stoßwellen der EFD 0,5 mJ/mm² zu einer Veränderung der molekularen Zusammensetzung des Gelenkknorpels führen, erstmals bestätigt werden.

Der genaue Mechanismus, der die beobachteten Veränderungen im Knorpel nach Stoßwellenapplikation in Gang setzt, ist nicht bekannt. In der Literatur werden zwei Möglichkeiten der Stoßwellenwirkung genannt (Gerdesmeyer et al. 2002; Ogden et al. 2001):

- Zum einen die direkte Wirkung, die sich an Grenzflächen zweier Gewebearten unterschiedlicher akustischer Impedanz entfaltet. Diese direkte Wirkung kann als mechanische Belastung des Knorpels gewertet werden. *In vitro* Untersuchungen ergaben, dass Chondrozyten auf veränderte mechanische Belastung, die zu einer Schädigung des Knorpels führen kann, mit einer Aufregulation der synthetischen Aktivität (vor allem Matrix-verdauender Enzyme) und zunehmender Produktion inflammatorischer Zytokine reagieren. Insbesondere eine vermehrte statische Kompression führt dadurch zu gesteigertem Abbau der Proetoglykane und Schäden des Kollagennetzwerks sowie langfristig zu einer verminderten Synthese der Komponenten der extrazellulären Matrix (Guilak et al. 2004). Durch diesen Mechanismus könnte das gesteigerte Vorkommen von Tenascin C erklärt werden, denn es wurde bereits gezeigt, dass Tenascin C in Geweben unter mechanischem Stress aufreguliert wird (Fluck et al. 2000).
- Die indirekte Wirkung von Stoßwellen erfolgt über die Induktion von Kavitationsblasen, die bei ihrem Kollaps Flüssigkeitsströme (Jetstreams) erzeugen, die lokale Gewebeschäden hervorrufen können. Eine Schädigung der Knorpelmatrix durch diese Jetstreams wäre denkbar. In beiden Fällen sind Tenascin C und CHI3L1 möglicherweise als protektive Faktoren an der Gegenregulation der verursachten Schäden beteiligt.

Tenascin C war in den Gruppen I bis III nachweisbar. CHI3L1 und Col 2- $\frac{3}{4}$ m ließen sich in Gruppe III auch am unbehandelten Hüftgelenk feststellen. Der Fokus der verwendeten Stoßwellenquelle Typ XL1 der Firma Dornier (Wessling, Deutschland) hat eine räumliche Ausdehnung von 3,1 x 0,36 cm. Die Hüftgelenke der Ratten lagen im Schnitt 2,2 cm auseinander. Wenn der Fokus der Stoßwellen exakt auf das rechte Hüftgelenk eingestellt wird, reicht er bis auf wenige Millimeter an das linke Hüftgelenk heran. Aufgrund dieser anatomischen Gegebenheit ist davon auszugehen, dass ein Teil der Stoßwellenenergie auch im unbehandelten Hüftgelenk freigesetzt wird. Dieser Zusammenhang erklärt das Vorkommen von Tenascin C, CHI3L1 und Col 2- $\frac{3}{4}$ m auch in der linken Hüfte. Je nach Größe des Fokus der verwendeten Stoßwellenquelle eignet sich somit die Untersuchung deren Wirkung am Hüftgelenk der Ratte nur bedingt, da es zu einer ungewollten Mitbehandlung des zweiten Hüftgelenks kommen kann.

Im Gegensatz zu Tenascin C war CHI3L1 nur innerhalb der Chondrozyten und nicht in der Knorpelmatrix nachweisbar. Dieses Phänomen wurde von anderen Autoren bereits beschrieben (Trudel et al. 2007; Volck et al. 2001). Als mögliche Ursachen dafür gaben Volck et al. entweder eine zu geringe Menge von CHI3L1 innerhalb der Knorpelmatrix oder die Bindung von CHI3L1 an andere Moleküle an, die einen Nachweis mittels Immunhistochemie verhindern.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Stoßwellen *in vivo* zu einer Veränderung der molekularen Zusammensetzung des Gelenkknorpels führen. Tenascin C und CHI3L1 gelten als protektive Faktoren im Rahmen der Knorpeldegeneration. Die vermehrte Expression dieser extrazellulären Matrixproteine wird im Rahmen einer Arthroseentstehung beobachtet und ist als Gegenregulationsmechanismus des hyalinen Gelenkknorpels aufzufassen (Ling and Recklies 2004; Veje et al. 2003). Ein gesteigertes Vorkommen im gesunden hyalinen Gelenkknorpel konnte nicht beobachtet werden. Die Aufregulation der oben genannten Proteine entspricht einem sehr frühen Stadium des Knorpelversagens.

Die traumatische Schädigung des Knorpels geht auch mit einer solchen Aufregulation von extrazellulären Matrixproteinen einher (Pfander et al. 1999; Lorenz et al. 2005). Das durch die Applikation von extrakorporalen Stoßwellen am Rattenknorpel induzierte vermehrte Vorkommen von Tenascin C und CHI3L1 stellt wahrscheinlich einen Effekt der mechanischen Belastung des Knorpels durch die Stoßwellen dar.

Diese Traumatisierung bewirkt den in der vorliegenden Studie gezeigten kurzfristigen Effekt, ähnlich den Ergebnissen aus der Literatur in frühen Arthrostadien (Veje et al. 2003). Ein langfristiger Effekt konnte durch die vorliegende Arbeit nicht nachgewiesen werden. Das Vorkommen von Kollagenspaltprodukten zehn Wochen nach Stoßwellenapplikation spricht jedoch für das Vorliegen von nicht reversiblen Umbauvorgängen des Gelenkknorpels.

Studien mit Pferdeknoorpelpräparaten wiesen ebenfalls einen schädigenden Effekt extrakorporaler Stoßwellen nach. An diesen konnte gezeigt werden, dass Stoßwellen *in vitro* zu einer Verminderung der Glykosaminoglykansynthese führen (Benson et al. 2007). Ein Mangel dieser elementaren Bausteine des Knorpelgerüsts könnte zu einem Verlust der Knorpelstruktur führen. Des Weiteren wurde eine Verringerung der Lebensfähigkeit und eine Steigerung der Membrandurchlässigkeit von Chondrozyten nach Applikation extrakorporaler Stoßwellen gezeigt (Byron et al. 2005).

Ein positiver Effekt der Stoßwellentherapie konnte von Murata et al. gezeigt werden. Die Autoren stellten eine Verbesserung des Gentransfers in der Chondrozytenkultur nach Stoßwellenapplikation fest (Murata et al. 2007). Allerdings war dieser positive Effekt nicht sehr ausgeprägt und es kam zusätzlich zu einem unerwünschten Absterben von Zellen. Diesen schädigenden Effekt müsste man bei der von den Autoren vorgeschlagenen Anwendung im Rahmen von beispielsweise Tissue Engineering in Kauf nehmen.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen posttraumatischen Veränderungen könnten bei einer weiteren Progression zu dem in Abbildung 5.1 dargestellten Verlauf führen. Stoßwellen hätten dabei die Bedeutung einer mechanischen Traumatisierung des Knorpels, die den dargestellten Prozess initiieren würde. Allerdings kann anhand der vorliegenden Ergebnisse keine endgültige Aussage getroffen werden, ob es nach Stoßwellentherapie tatsächlich zu einer Zunahme an Kollagenspaltprodukten und anderen posttraumatischen Veränderungen kommt. Zum einen wurde ein kurzer Untersuchungszeitraum von zehn Wochen gewählt, der keine Aussage über langfristige Veränderungen erlaubt. Zum anderen war Col 2- $\frac{3}{4}$ m nicht in allen Präparaten der behandelten Hüfte nachweisbar war und es kann sich bei dem Signal für Col 2- $\frac{3}{4}$ m nicht um eine große Menge an denaturiertem Kollagen handeln, da keine Korrelation zu pathologischen Veränderungen in der Safranin-O Färbung bestand, wie dies üblicherweise der Fall ist (Hollander et al. 1995). Weitere

Studien mit zusätzlichen Markern (beispielsweise die Matrix-Metalloproteinasen 1, 3, 8 und 13) und längeren Beobachtungszeiträumen sollten auf den vorliegenden Befunden aufbauen.

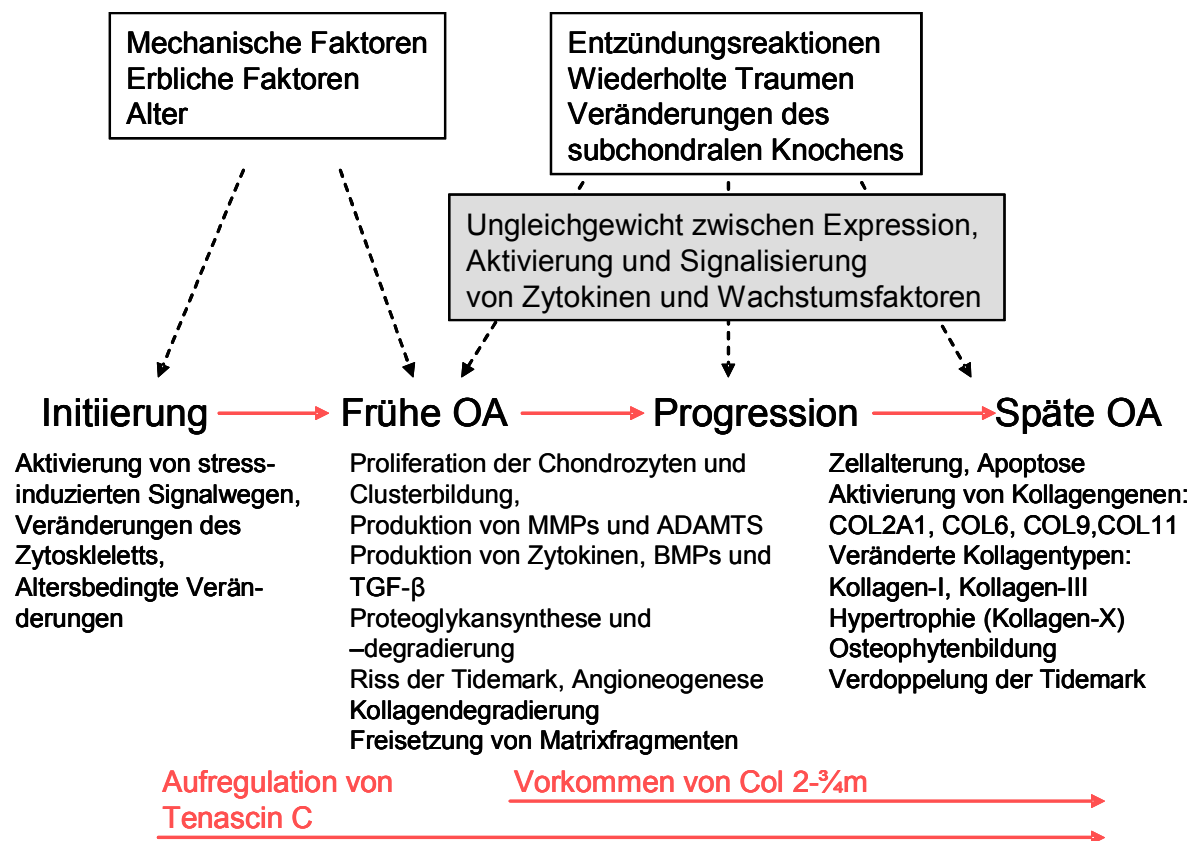


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der einzelnen Elemente, die bei der Entstehung einer (posttraumatischen) Arthrose beteiligt sind, im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit verwendeten Markern Tenascin C und Col 2- $\frac{3}{4}$ m; Bemerkung: CHI3L1 wurde ausgelassen, da dessen Bedeutung bei der Arthroseentwicklung nicht endgültig geklärt ist;

Abkürzungen: OA=Osteoarthritis, MMP=Matrix-Metalloproteinase, BMP=Bone Morphogenetic Protein, TGF=Transforming Growth Factor

(eigene Darstellung in Anlehnung an Goldring and Goldring 2007)

In Abbildung 5.1 ist auch die Rolle der Marker Tenascin C und Col 2- $\frac{3}{4}$ m dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass Tenascin C bereits sehr früh aufreguliert wird. Col 2- $\frac{3}{4}$ m hingegen ist erst zu einem späteren Zeitpunkt vermehrt nachweisbar, da es erst nach enzymatischer Spaltung durch Matrix-Metalloproteinasen entsteht. Diese werden im Rahmen posttraumatischer Veränderungen früh aufreguliert und führen dann im Verlauf zur Anhäufung von Kollagenspaltprodukten (Fernandes et al. 1998; Wu et al. 2002). Dieser zeitliche Ablauf konnte auch in der vorliegenden Arbeit

beobachtet werden. Es wäre also möglich, dass zehn Wochen nach Stoßwellenbehandlung die Kollagendenaturierung gerade begonnen hat und damit eine weitere Zunahme über einen längeren Beobachtungszeitraum feststellbar gewesen wäre. Ebenso ist es denkbar, dass es zu keiner Zunahme an Col 2-³/₄m kommt und die vereinzelt nachgewiesene Menge an denaturiertem Kollagen keine klinische Relevanz hat. Auch hier können Studien mit längeren Beobachtungszeiträumen neue Erkenntnisse bringen.

Renz und Rupp führten Versuche mit Chondrozyten in Zellkultur durch. Sie applizierten Stoßwellen einer Energieflussdichte von 0,08 und 0,26 mJ/mm² jeweils auf in Suspension befindliche und in Alginat eingebettete Chondrozyten. Dabei wurde ein großer Anteil der in Suspension befindlichen Chondrozyten durch die Stoßwellen zerstört. Die Chondrozytenkultur in Alginat hingegen wies keinen signifikanten Anstieg abgestorbener Zellen nach Stoßwellenapplikation auf. Die viskoelastischen Eigenschaften der Alginatkultur sind denen des Gelenkknorpels ähnlicher als eine Suspension und geben daher eher die Bedingungen *in vivo* wieder. Die Autoren schlossen aus diesen Befunden, dass die Risiken der Anwendung extrakorporaler Stoßwellen am Gelenkknorpel vernachlässigbar seien (Renz and Rupp 2008). Dennoch lässt sich mit den Ergebnissen der Studie von Renz und Rupp eine mögliche unerwünschte Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf Gelenkknorpel nicht sicher ausschließen, da die Wirkung von Stoßwellen einer höheren Energieflussdichte (> 0,26 mJ/mm²) nicht untersucht wurde. Des Weiteren kann sich das Verhalten der Chondrozyten in Kultur – auch in Alginat – von dem *in vivo* unterscheiden. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Veränderungen widersprechen den Beobachtungen von Renz und Rupp nicht unbedingt, da hier mit einer höheren Energieflussdichte gearbeitet wurde. Diese Applikationsform kommt beim Menschen bei der Behandlung der Tendinosis calcarea der Schulter (Hsu et al. 2008), der aseptischen Pseudarthrose (Schaden et al. 2001) und im Rahmen von klinischen Studien bei der Behandlung von aseptischen Hüftkopfnekrosen (Ludwig et al. 2001) zum Einsatz.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit erstmals eine Veränderung der molekularen Zusammensetzung des Gelenkknorpels nach Applikation extrakorporaler Stoßwellen der Energieflussdichte 0,5 mJ/mm² *in vivo* gezeigt werden konnte. Zum einen wurde eine vermehrte Expression der knorpelprotektiven Faktoren Tenascin C und CHI3L1 festgestellt. Zum anderen war vereinzelt eine Anhäufung von Kollagenspaltprodukten nachweisbar. Diese Befunde könnten einem

frühen Stadium posttraumatischer Knorpelveränderungen entsprechen. Die endgültige Bedeutung der gefundenen Veränderungen lässt sich anhand der vorliegenden Studie jedoch nicht beurteilen. Die Ergebnisse sind allerdings ein erster Hinweis auf eine Schädigung des Gelenkknorpels nach Applikation extrakorporaler Stoßwellen der Energieflussdichte $0,5 \text{ mJ/mm}^2$.

6. Zusammenfassung

Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob es durch die Applikation von Stoßwellen der Energieflussdichte $0,5 \text{ mJ/mm}^2$ zu einer Veränderung der molekularen Zusammensetzung des Gelenkknorpels kommt. Extrakorporale Stoßwellen werden als Therapieverfahren unter anderem zur Behandlung der Tendinosis calcarea der Schulter und der Hüftkopfnekrose eingesetzt. Dabei liegt der Gelenkknorpel häufig im Behandlungsgebiet. Eine mögliche Schädigung des Gelenkknorpels nach Stoßwellenbehandlung wurde bisher kaum untersucht.

Material und Methoden

18 männliche Sprague-Dawley Ratten wurden am rechten Hüftgelenk mit 1500 Stoßwellen der Energieflussdichte $0,5 \text{ mJ/mm}^2$ behandelt und in drei Gruppen eingeteilt, die nach je einer, vier oder zehn Wochen untersucht wurden. Zusätzlich wurden zwei Tiere als Kontrollen scheinbehandelt. Vor und nach Stoßwellenapplikation wurden Kontaktradiografien angefertigt. Das rechte und linke Hüftgelenk wurde nach Ablauf der Nachbeobachtungszeit entnommen und der Knorpel wurde histologisch mit einer Safranin-O Färbung und immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Tenascin C, Chitinase-3-like Protein 1 (CHI3L1) und Col $2\text{-}^{3/4}\text{m}$ untersucht.

Ergebnisse

Die Färbung mit Safranin-O ergab keine pathologischen Befunde. Tenascin C zeigte dagegen in allen Gruppen ein gesteigertes Signal auf der behandelten Seite sowohl im Vergleich zur unbehandelten als auch im Vergleich zur Kontrollgruppe. CHI3L1 ließ sich in der Kontrollgruppe nicht und bei den behandelten Tieren erst nach zehn Wochen im unbehandelten und behandelten Hüftgelenk nachweisen. Ein Vorkommen von Col $2\text{-}^{3/4}\text{m}$ zeigte sich in einzelnen Präparaten der behandelten und unbehandelten Hüfte nach zehn Wochen.

Schlussfolgerungen

Die extrazellulären Matrixproteine Tenascin C und CHI3L1 spielen eine protektive Rolle bei der Knorpeldegeneration und deuten damit auf einen nach Stoßwellenap-

plikation ablaufenden Reparatursprozess hin. Das Vorkommen von Col 2- $\frac{3}{4}$ m zeigt eine Schädigung des Kollagennetzwerks an, die zu einer Degeneration des Gelenkknorpels führen könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals eine Veränderung der molekularen Zusammensetzung des Gelenkknorpels nach Applikation von Stoßwellen der Energieflussdichte 0,5 mJ/mm² und geben einen wichtigen Ansatzpunkt für zukünftige Studien, die Wirkungen extrakorporaler Stoßwellen auf den Gelenkknorpel weiter untersuchen.

7. Literatur

- Aigner, T., and S. Soder. 2006. Histopathologische Begutachtung der Gelenkdegeneration. *Pathologe* 27.431-8.
- Aigner, T., H. Stoss, G. Weseloh, G. Zeiler, and Mark K. von der. 1992. Activation of collagen type II expression in osteoarthritic and rheumatoid cartilage. *Virchows Arch.B Cell Pathol.Incl.Mol.Pathol.* 62.337-45.
- Appleton, C. T., D. D. McErlain, V. Pitelka, N. Schwartz, S. M. Bernier, J. L. Henry, D. W. Holdsworth, and F. Beier. 2007a. Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Res.Ther.* 9.R13.
- Appleton, C. T., V. Pitelka, J. Henry, and F. Beier. 2007b. Global analyses of gene expression in early experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 56.1854-68.
- Augat, P., L. Claes, and G. Suger. 1995. In vivo effect of shock-waves on the healing of fractured bone. *Clin.Biomech.(Bristol., Avon.)* 10.374-8.
- Bendele, A. M. 2001. Animal models of osteoarthritis. *J.Musculoskelet.Neuronal.Interact.* 1.363-76.
- Benson, B. M., C. R. Byron, H. Pondenis, and A. A. Stewart. 2007. The effects of radial shock waves on the metabolism of equine cartilage explants in vitro. *N.Z Vet.J.* 55.40-4.
- Billinghurst, R. C., L. Dahlberg, M. Ionescu, A. Reiner, R. Bourne, C. Rorabeck, P. Mitchell, J. Hambor, O. Diekmann, H. Tschesche, J. Chen, Wart H. Van, and A. R. Poole. 1997. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J.Clin.Invest* 99.1534-45.
- Brendel, W. 1984. Stoßwellen. Ein neues therapeutisches Prinzip in der Medizin. *MMW.Munch.Med.Wochenschr.* 126.1-3.
- Brissot, R., A. Lassalle, S. Vincendeau, J. L. Polard, M. Fouche, D. Ninubona, G. Mahieux, J. Chaperon, and B. Lobel. 2005. [Treatment of heterotopic ossification by extracorporeal shock wave: 26 patients]. *Ann.Readapt.Med.Phys.* 48.581-9.
- Bruckner, P., and M. van der Rest. 1994. Structure and function of cartilage collagens. *Microsc.Res.Tech.* 28.378-84.
- Byron, C. R., B. M. Benson, A. A. Stewart, and M. C. Stewart. 2005. Effects of radial shock waves on membrane permeability and viability of chondrocytes and structure of articular cartilage in equine cartilage explants. *Am.J.Vet.Res.* 66.1757-63.
- Cacchio, A., M. Paoloni, A. Barile, R. Don, Paulis F. de, V. Calvisi, A. Ranavolo, M. Frascarelli, V. Santilli, and G. Spacca. 2006. Effectiveness of radial shock-wave therapy for calcific tendinitis of the shoulder: single-blind, randomized clinical study. *Phys.Ther.* 86.672-82.

- Carter, D. R., G. S. Beaupre, M. Wong, R. L. Smith, T. P. Andriacchi, and D. J. Schurman. 2004. The mechanobiology of articular cartilage development and degeneration. *Clin.Orthop Relat Res.*S69-S77.
- Cawston, T. E., and A. J. Wilson. 2006. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best.Pract.Res.Clin.Rheumatol.* 20.983-1002.
- Chaussy, C., W. Brendel, and E. Schmiedt. 1980. Extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves. *Lancet* 2.1265-8.
- Chaussy, C., E. Schmiedt, D. Jocham, W. Brendel, B. Forssmann, and V. Walther. 1982. First clinical experience with extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves. *J.Urol.* 127.417-20.
- Chen, Y. J., T. Wurtz, C. J. Wang, Y. R. Kuo, K. D. Yang, H. C. Huang, and F. S. Wang. 2004. Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF-beta 1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats. *J.Orthop Res.* 22.526-34.
- Chevalier, X., N. Groult, B. Larget-Piet, L. Zardi, and W. Hornebeck. 1994. Tenascin distribution in articular cartilage from normal subjects and from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 37.1013-22.
- Chiquet-Ehrismann, R., C. Hagios, and S. Schenk. 1995. The complexity in regulating the expression of tenascins. *Bioessays* 17.873-8.
- Chiquet-Ehrismann, R., E. J. Mackie, C. A. Pearson, and T. Sakakura. 1986. Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* 47.131-9.
- Connor, J. R., R. A. Dodds, J. G. Emery, R. B. Kirkpatrick, M. Rosenberg, and M. Gowen. 2000. Human cartilage glycoprotein 39 (HC gp-39) mRNA expression in adult and fetal chondrocytes, osteoblasts and osteocytes by in-situ hybridization. *Osteoarthritis.Cartilage.* 8.87-95.
- Delius, M., K. Draenert, Diek Y. Al, and Y. Draenert. 1995. Biological effects of shock waves: in vivo effect of high energy pulses on rabbit bone. *Ultrasound Med.Biol.* 21.1219-25.
- Durst, H. B., G. Blatter, and M. S. Kuster. 2002. Osteonecrosis of the humeral head after extracorporeal shock-wave lithotripsy. *J.Bone Joint Surg.Br.* 84.744-6.
- Eisenberger, F., and C. Chaussy. 1978. Contact-free renal stone fragmentation with shock waves. *Urol.Res.* 6.111.
- Elliott, J., de J. Ng, and S. K. Tham. 2006. Chondrocyte apoptosis in response to dislocation of the hip in the rat model. *ANZ.J.Surg.* 76.398-402.
- Fernandes, J. C., J. Martel-Pelletier, V. Lascau-Coman, F. Moldovan, D. Jovanovic, J. P. Raynauld, and J. P. Pelletier. 1998. Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in normal and early experimental osteoarthritic canine cartilage: an immunohistochemical study. *J.Rheumatol.* 25.1585-94.

- Fluck, M., V. Tunc-Civelek, and M. Chiquet. 2000. Rapid and reciprocal regulation of tenascin-C and tenascin-Y expression by loading of skeletal muscle. *J.Cell Sci.* 113 (Pt 20).3583-91.
- Folberth, W., G. Kohler, A. Rohwedder, and E. Matura. 1992. Pressure distribution and energy flow in the focal region of two different electromagnetic shock wave sources. *J.Stone.Dis.* 4.1-7.
- Forriol, F., L. Solchaga, J. L. Moreno, and J. Canadell. 1994. The effect of shock-waves on mature and healing cortical bone. *Int.Orthop.* 18.325-9.
- Forssmann, B., W. Hepp, C. Chaussy, F. Eisenberger, and K. Wanner. 1977. Eine Methode zur berührungsfreien Zertrümmerung von Nierensteinen durch Stoßwellen. *Biomed.Tech.(Berl)* 22.164-8.
- Gerdesmeyer, L., M. Maier, M. Haake, and C. Schmitz. 2002. Physikalisch-technische Grundlagen der extrakorporalen Stoßwellentherapie (ESWT). *Orthopäde* 31.610-7.
- Gerdesmeyer, L., S. Wagenpfeil, M. Haake, M. Maier, M. Loew, K. Wortler, R. Lampe, R. Seil, G. Handle, S. Gassel, and J. D. Rompe. 2003. Extracorporeal shock wave therapy for the treatment of chronic calcifying tendonitis of the rotator cuff: a randomized controlled trial. *JAMA* 290.2573-80.
- Goldring, M. B., and S. R. Goldring. 2007. Osteoarthritis. *J.Cell Physiol* 213.626-34.
- Goto, T., T. Yamaza, M. A. Kido, and T. Tanaka. 1998. Light- and electron-microscopic study of the distribution of axons containing substance P and the localization of neurokinin-1 receptor in bone. *Cell Tissue Res.* 293.87-93.
- Graff, J., K. D. Richter, and J. Pastor. 1988. Effect of high energy shock waves on bony tissue. *Urol.Res.* 16.252-8.
- Guilak, F., B. Fermor, F. J. Keefe, V. B. Kraus, S. A. Olson, D. S. Pisetsky, L. A. Setton, and J. B. Weinberg. 2004. The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. *Clin.Orthop.Relat Res.*17-26.
- Gyarmati, J., I. Foldes, M. Kern, and I. Kiss. 1987. Morphological studies on the articular cartilage of old rats. *Acta Morphol.Hung.* 35.111-24.
- Haake, M., I. R. Boddeker, T. Decker, M. Buch, M. Vogel, G. Labek, M. Maier, M. Loew, O. Maier-Boerries, J. Fischer, A. Betthausen, H. C. Rehack, W. Kanovsky, I. Muller, L. Gerdesmeyer, and J. D. Rompe. 2002. Side-effects of extracorporeal shock wave therapy (ESWT) in the treatment of tennis elbow. *Arch.Orthop.Trauma Surg.* 122.222-8.
- Hakala, B. E., C. White, and A. D. Recklies. 1993. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J.Biol.Chem.* 268.25803-10.
- Hardingham, T. E., V. Rayan, and J. C. Lewthwaite. 1994. [Regulation of cartilage matrix synthesis by chondrocytes]. *Rev.Rhum.Ed Fr.* 61.93S-8S.

- Harvey, S., M. Weisman, J. O'Dell, T. Scott, M. Krusemeier, J. Visor, and C. Swindlehurst. 1998. Chondrex: new marker of joint disease. *Clin.Chem.* 44.509-16.
- Haupt, G., A. Haupt, A. Ekkernkamp, B. Gerety, and M. Chvapil. 1992. Influence of shock waves on fracture healing. *Urology* 39.529-32.
- Hollander, A. P., T. F. Heathfield, C. Webber, Y. Iwata, R. Bourne, C. Rorabeck, and A. R. Poole. 1994. Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay. *J.Clin.Invest* 93.1722-32.
- Hollander, A. P., I. Pidoux, A. Reiner, C. Rorabeck, R. Bourne, and A. R. Poole. 1995. Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *J.Clin.Invest* 96.2859-69.
- Horton, W. E., Jr., R. Yagi, D. Lavery, and S. Weiner. 2005. Overview of studies comparing human normal cartilage with minimal and advanced osteoarthritic cartilage. *Clin.Exp.Rheumatol.* 23.103-12.
- Howell, D. A., R. M. Dy, B. L. Hanson, S. F. Nezhad, and S. B. Broaddus. 1999. Endoscopic treatment of pancreatic duct stones using a 10F pancreatoscope and electrohydraulic lithotripsy. *Gastrointest.Endosc.* 50.829-33.
- Hsu, C. J., D. Y. Wang, K. F. Tseng, Y. C. Fong, H. C. Hsu, and Y. F. Jim. 2008. Extracorporeal shock wave therapy for calcifying tendinitis of the shoulder. *J.Shoulder.Elbow.Surg.* 17.55-9.
- Hsu, R. W., C. L. Tai, C. Y. Chen, W. H. Hsu, and S. Hsueh. 2003. Enhancing mechanical strength during early fracture healing via shockwave treatment: an animal study. *Clin.Biomech.(Bristol., Avon.)* 18.S33-S39.
- Hyllested, J. L., K. Veje, and K. Ostergaard. 2002. Histochemical studies of the extracellular matrix of human articular cartilage--a review. *Osteoarthritis.Cartilage.* 10.333-43.
- Ikeda, K., K. Tomita, and K. Takayama. 1999. Application of extracorporeal shock wave on bone: preliminary report. *J.Trauma* 47.946-50.
- Iro, H., N. Nitsche, H. T. Schneider, and C. Ell. 1989. Extracorporeal shockwave lithotripsy of salivary gland stones. *Lancet* 2.115.
- Iro, H., J. Zenk, F. Waldfahrer, W. Benzel, T. Schneider, and C. Ell. 1998. Extracorporeal shock wave lithotripsy of parotid stones. Results of a prospective clinical trial. *Ann.Otol.Rhinol.Laryngol.* 107.860-4.
- Johannes, E. J., D. M. Kaulesar Sukul, and E. Matura. 1994. High-energy shock waves for the treatment of nonunions: an experiment on dogs. *J.Surg.Res.* 57.246-52.
- Jubb, R. W., and F. M. Eggert. 1981. Staining of demineralized cartilage. II. Quantitation of articular cartilage proteoglycan after fixation and rapid demineralization. *Histochemistry* 73.391-6.

- Kaulesar Sukul, D. M., E. J. Johannes, E. G. Pierik, G. J. van Eijck, and M. J. Kristelijns. 1993. The effect of high energy shock waves focused on cortical bone: an in vitro study. *J.Surg.Res.* 54.46-51.
- Kempson, G. E., H. Muir, C. Pollard, and M. Tuke. 1973. The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans. *Biochim.Biophys.Acta* 297.456-72.
- Kiraly, K., T. Lapvetelainen, J. Arokoski, K. Torronen, L. Modis, I. Kiviranta, and H. J. Helminen. 1996. Application of selected cationic dyes for the semiquantitative estimation of glycosaminoglycans in histological sections of articular cartilage by microspectrophotometry. *Histochem.J.* 28.577-90.
- Kiviranta, I., J. Jurvelin, M. Tammi, A. M. Saamanen, and H. J. Helminen. 1985. Microspectrophotometric quantitation of glycosaminoglycans in articular cartilage sections stained with Safranin O. *Histochemistry* 82.249-55.
- Kneißel, N. 2003. Untersuchung der Chondrogenese humaner mesenchymaler Stammzellen des Knochenmarks in vitro durch Einbettung in Agarose.
- Koukoulis, G. K., V. E. Gould, A. Bhattacharyya, J. E. Gould, A. A. Howedy, and I. Virtanen. 1991. Tenascin in normal, reactive, hyperplastic, and neoplastic tissues: biologic and pathologic implications. *Hum.Pathol.* 22.636-43.
- Krause, H. Physik und Technik medizinischer Stoßwellensysteme. Rompe, J. D. [Extrakorporale Stoßwellentherapie], 15-34. 1997. Chapman&Hall, Weinheim. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- Kusnierczak, D., D. R. Brocai, U. Vettel, and M. Loew. 2000. Der Einfluß der extrakorporalen Stoßwellenapplikation (ESWA) auf das biologische Verhalten von Knochenzellen in vitro. *Z.Orthop.Ihre Grenzgeb.* 138.29-33.
- Lindblad-Toh, K. 2004. Genome sequencing: three's company. *Nature* 428.475-6.
- Ling, H., and A. D. Recklies. 2004. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 inhibits cellular responses to the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. *Biochem.J.* 380.651-9.
- Liu, H. M., C. M. Chao, J. Y. Hsieh, and C. C. Jiang. 2006. Humeral head osteonecrosis after extracorporeal shock-wave treatment for rotator cuff tendinopathy. A case report. *J.Bone Joint Surg.Am.* 88.1353-6.
- Loew, M., W. Jurgowski, H. C. Mau, and M. Thomsen. 1995. Treatment of calcifying tendinitis of rotator cuff by extracorporeal shock waves: a preliminary report. *J.Shoulder.Elbow.Surg.* 4.101-6.
- Lorenz, H., and W. Richter. 2006. Osteoarthritis: cellular and molecular changes in degenerating cartilage. *Prog.Histochem.Cytochem.* 40.135-63.
- Lorenz, H., W. Wenz, M. Ivancic, E. Steck, and W. Richter. 2005. Early and stable upregulation of collagen type II, collagen type I and YKL40 expression levels in cartilage during early experimental osteoarthritis occurs independent of joint location and histological grading. *Arthritis Res.Ther.* 7.R156-R165.

- Ludwig, J., S. Lauber, H. J. Lauber, U. Dreisilker, R. Raedel, and H. Hotzinger. 2001. High-energy shock wave treatment of femoral head necrosis in adults. *Clin.Orthop.Relat Res.*119-26.
- Mackie, E. J., and S. Ramsey. 1996. Expression of tenascin in joint-associated tissues during development and postnatal growth. *J.Anat.* 188 (Pt 1).157-65.
- Mackie, E. J., I. Thesleff, and R. Chiquet-Ehrismann. 1987. Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro. *J.Cell Biol.* 105.2569-79.
- Maier, M., B. Aeverbeck, S. Milz, H. J. Refior, and C. Schmitz. 2003. Substance P and prostaglandin E2 release after shock wave application to the rabbit femur. *Clin.Orthop.Relat Res.*237-45.
- Maier, M., H. R. Dürr, S. Kohler, D. Staupendahl, M. Pfahler, and H. J. Refior. 2000a. Analgetische Wirkung niederenergetischer extrakorporaler Stoßwellen bei Tendinosis calcarea, Epikondylitis humeri radialis und Plantarfasziitis. *Z.Orthop.Ihre Grenzgeb.* 138.34-8.
- Maier, M., J. Hausdorf, T. Tischer, S. Milz, C. Weiler, H. J. Refior, and C. Schmitz. 2004. Knochenneubildung durch extrakorporale Stoßwellen. *Orthopäde* 33.1401-10.
- Maier, M., S. Milz, T. Tischer, W. Munzing, N. Manthey, A. Stabler, N. Holzknecht, C. Weiler, A. Nerlich, H. J. Refior, and C. Schmitz. 2002. Influence of extracorporeal shock-wave application on normal bone in an animal model in vivo. Scintigraphy, MRI and histopathology. *J.Bone Joint Surg.Br.* 84.592-9.
- Maier, M., A. Stabler, A. Lienemann, S. Kohler, A. Feitenhansl, H. R. Durr, M. Pfahler, and H. J. Refior. 2000b. Shockwave application in calcifying tendinitis of the shoulder--prediction of outcome by imaging. *Arch.Orthop Trauma Surg.* 120.493-8.
- Maier, M., M. Steinborn, C. Schmitz, A. Stabler, S. Kohler, M. Pfahler, H. R. Durr, and H. J. Refior. 2000c. Extracorporeal shock wave application for chronic plantar fasciitis associated with heel spurs: prediction of outcome by magnetic resonance imaging. *J.Rheumatol.* 27.2455-62.
- Maier, M., M. Steinborn, C. Schmitz, A. Stabler, S. Kohler, A. Veihelmann, M. Pfahler, and H. J. Refior. 2001. Extracorporeal shock-wave therapy for chronic lateral tennis elbow--prediction of outcome by imaging. *Arch.Orthop.Trauma Surg.* 121.379-84.
- Mankin, H. J., H. Dorfman, L. Lippiello, and A. Zarins. 1971. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J.Bone Joint Surg.Am.* 53.523-37.
- Martin, J. A., and J. A. Buckwalter. 2006. Post-traumatic osteoarthritis: the role of stress induced chondrocyte damage. *Biorheology* 43.517-21.

- Martini, L., M. Fini, G. Giavaresi, P. Torricelli, Pretto M. de, L. Rimondini, and R. Giardino. 2003a. Primary osteoblasts response to shock wave therapy using different parameters. *Artif.Cells Blood Substit.Immobil.Biotechnol.* 31.449-66.
- Martini, L., G. Giavaresi, M. Fini, P. Torricelli, Pretto M. de, W. Schaden, and R. Giardino. 2003b. Effect of extracorporeal shock wave therapy on osteoblast-like cells. *Clin.Orthop.Relat Res.*269-80.
- Marx, S., and R. Thiele. 2003. Fallvorstellung der arthroskopisch kontrollierten Therapie der Osteochondrosis dissecans mittels ESWT. *Arthroskopie* 16.266-71.
- May, T. C., W. R. Krause, A. J. Preslar, M. J. Smith, A. J. Beaudoin, and J. A. Cardea. 1990. Use of high-energy shock waves for bone cement removal. *J.Arthroplasty* 5.19-27.
- Middleton, J. F., and J. A. Tyler. 1992. Upregulation of insulin-like growth factor I gene expression in the lesions of osteoarthritic human articular cartilage. *Ann.Rheum.Dis.* 51.440-7.
- Murata, R., K. Nakagawa, S. Ohtori, N. Ochiai, M. Arai, T. Saisu, T. Sasho, K. Takahashi, and H. Moriya. 2007. The effects of radial shock waves on gene transfer in rabbit chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis.Cartilage.* 15.1275-82.
- Murphy-Ullrich, J. E., M. A. Pallero, N. Boerth, J. A. Greenwood, T. M. Lincoln, and T. L. Cornwell. 1996. Cyclic GMP-dependent protein kinase is required for thrombospondin and tenascin mediated focal adhesion disassembly. *J.Cell Sci.* 109 (Pt 10).2499-508.
- Nassenstein, K., I. Nassenstein, and R. Schleberger. 2005. Wirkung hochenergetischer extrakorporaler Stoßwellen auf Wachstumsfugen - Eine histomorphologische Studie. *Z.Orthop.Ihre Grenzgeb.* 143.652-5.
- Oda, J. Y., E. A. Liberti, L. B. Maifrino, and R. R. de Souza. 2007. Variation in articular cartilage in rats between 3 and 32 months old. A histomorphometric and scanning electron microscopy study. *Biogerontology.* 8.345-52.
- Ogden, J. A., A. Toth-Kischkat, and R. Schultheiss. 2001. Principles of shock wave therapy. *Clin.Orthop.Relat Res.*8-17.
- Ohtori, S., G. Inoue, C. Mannoji, T. Saisu, K. Takahashi, S. Mitsunashi, Y. Wada, K. Takahashi, M. Yamagata, and H. Moriya. 2001. Shock wave application to rat skin induces degeneration and reinnervation of sensory nerve fibres. *Neurosci.Lett.* 315.57-60.
- Ostergaard, K., C. B. Andersen, J. Petersen, K. Bendtzen, and D. M. Salter. 1999. Validity of histopathological grading of articular cartilage from osteoarthritic knee joints. *Ann.Rheum.Dis.* 58.208-13.
- Pfander, D., N. Heinz, P. Rothe, H. D. Carl, and B. Swoboda. 2004. Tenascin and aggrecan expression by articular chondrocytes is influenced by interleukin 1beta: a possible explanation for the changes in matrix synthesis during osteoarthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 63.240-4.

- Pfander, D., R. Rahmzadeh, and E. E. Scheller. 1999. Presence and distribution of collagen II, collagen I, fibronectin, and tenascin in rabbit normal and osteoarthritic cartilage. *J.Rheumatol.* 26.386-94.
- Plaas, A., B. Osborn, Y. Yoshihara, Y. Bai, T. Bloom, F. Nelson, K. Mikecz, and J. D. Sandy. 2007. Aggrecanolytic in human osteoarthritis: confocal localization and biochemical characterization of ADAMTS5-hyaluronan complexes in articular cartilages. *Osteoarthritis.Cartilage.* 15.719-34.
- Poole, A. R. 1970. The relationship between toluidine blue staining and hexuronic acid content of cartilage matrix. *Histochem.J.* 2.425-30.
- Poole, A. R. 2001. Cartilage in Health and Disease. *Arthritis and allied Conditions*, ed. by Koopman, W, 2260-84. New York: Lippincott Williams and Wilkins.
- Poole, A. R. 1986. Changes in the Collagen and Proteoglycan of Articular Cartilage in Arthritis. *Rheumatology* 10.316-71.
- Poole, A. R., F. Guilak, and S. B. Abramson. Etiopathogenesis of osteoarthritis. Moskowitz, M. C., Altman, R. W., Hochberg, M. C., Buckwalter, J. A., and Goldberg, V. M. [Osteoarthritis: Diagnosis and medical/surgical management. 4th edition.], 27-49. 2007. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- Recklies, A. D., C. White, and H. Ling. 2002. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways. *Biochem.J.* 365.119-26.
- Renz, H., and S. Rupp. 2008. Effects of shock waves on chondrocytes and their relevance in clinical practice. *Arch.Orthop Trauma Surg.*
- Rompe, J. D., C. Hope, K. Kullmer, J. Heine, and R. Burger. 1996a. Analgesic effect of extracorporeal shock-wave therapy on chronic tennis elbow. *J.Bone Joint Surg.Br.* 78.233-7.
- Rompe, J. D., C. Hopf, B. Nafe, and R. Burger. 1996b. Low-energy extracorporeal shock wave therapy for painful heel: a prospective controlled single-blind study. *Arch.Orthop.Trauma Surg.* 115.75-9.
- Rompe, J. D., C. J. Kirkpatrick, K. Kullmer, M. Schwitalle, and O. Krischek. 1998. Dose-related effects of shock waves on rabbit tendo Achillis. A sonographic and histological study. *J.Bone Joint Surg.Br.* 80.546-52.
- Rompe, J. D., F. Rumler, C. Hopf, B. Nafe, and J. Heine. 1995. Extracorporeal shock wave therapy for calcifying tendinitis of the shoulder. *Clin.Orthop.Relat Res.*196-201.
- Rompe, J. D., and C. J. Wirth. 2002. Applikation extrakorporaler Stoßwellen in der Orthopädie. *Orthopäde* 31.609.
- Rosenberg, L. 1971. Chemical basis for the histological use of safranin O in the study of articular cartilage. *J.Bone Joint Surg.Am.* 53.69-82.

- Rudert, M., and C. J. Wirth. 1998. Knorpelregeneration und Knorpelersatz. *Orthopäde* 27.W309-W321.
- Sackmann, M., T. Sauerbruch, J. Holl, and G. Paumgartner. 1988. Gallstone treatment by extracorporeal shock-wave lithotripsy. *J.Hepatol.* 7.283-7.
- Salter, D. M. 1993. Tenascin is increased in cartilage and synovium from arthritic knees. *Br.J.Rheumatol.* 32.780-6.
- Sandell, L. J., and T. Aigner. 2001. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res.* 3.107-13.
- Sauerbruch, T., M. Delius, G. Paumgartner, J. Holl, O. Wess, W. Weber, W. Hepp, and W. Brendel. 1986. Fragmentation of gallstones by extracorporeal shock waves. *N.Engl.J.Med.* 314.818-22.
- Sauerbruch, T., J. Holl, M. Sackmann, R. Werner, R. Wotzka, and G. Paumgartner. 1987. Disintegration of a pancreatic duct stone with extracorporeal shock waves in a patient with chronic pancreatitis. *Endoscopy* 19.207-8.
- Sauerbruch, T., and M. Stern. 1989. Fragmentation of bile duct stones by extracorporeal shock waves. A new approach to biliary calculi after failure of routine endoscopic measures. *Gastroenterology* 96.146-52.
- Schaden, W., A. Fischer, and A. Sailer. 2001. Extracorporeal shock wave therapy of nonunion or delayed osseous union. *Clin.Orthop.Relat Res.*90-4.
- Schleberger, R., and T. Senge. 1992. Non-invasive treatment of long-bone pseudarthrosis by shock waves (ESWL). *Arch.Orthop.Trauma Surg.* 111.224-7.
- Schmiedt, E., and C. Chaussy. 1984. Extracorporeal shock-wave lithotripsy (ESWL) of kidney and ureteric stones. *Int.Urol.Nephrol.* 16.273-83.
- Schoellner, C., J. D. Rompe, J. Decking, and J. Heine. 2002. Die hochenergetische extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) bei Pseudarthrose. *Orthopäde* 31.658-62.
- Sistermann, R., and B. D. Katthagen. 1998. Komplikationen, Nebenwirkungen und Kontraindikationen der Anwendung mittel- und hochenergetischer extrakorporaler Stoßwellen im orthopädischen Bereich. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 136.175-81.
- Smale, G., A. Bendele, and W. E. Horton, Jr. 1995. Comparison of age-associated degeneration of articular cartilage in Wistar and Fischer 344 rats. *Lab Anim Sci.* 45.191-4.
- Staudenraus, J. In vivo Stoßwellenmessung. Chaussy, C. [Die Stoßwelle in Forschung und Klinik], 21-26. 1995. Attempto, Tübingen.
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- Steck, E., S. Breit, S. J. Breusch, M. Axt, and W. Richter. 2002. Enhanced expression of the human chitinase 3-like 2 gene (YKL-39) but not chitinase 3-like 1

- gene (YKL-40) in osteoarthritic cartilage. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 299.109-15.
- Stoop, R., P. Buma, P. M. van der Kraan, A. P. Hollander, Billingham R. Clark, Poole A. Robin, and W. B. van den Berg. 2000. Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum.* 43.2121-31.
- Sulzbacher, I. 2000. Arthrose - Histologie und pathogenetische Ansätze. *Radiologe* 40.1126-33.
- Takahashi, N., Y. Wada, S. Ohtori, T. Saisu, and H. Moriya. 2003. Application of shock waves to rat skin decreases calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in dorsal root ganglion neurons. *Auton.Neurosci.* 107.81-4.
- Tetlow, L. C., D. J. Adlam, and D. E. Woolley. 2001. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum.* 44.585-94.
- Tischer, T., S. Milz, H. Anetzberger, P. E. Muller, D. C. Wirtz, C. Schmitz, F. Ueberle, and M. Maier. 2002. Extrakorporale Stoßwellen induzieren ventral-periostale Knochenneubildung außerhalb der Fokuszone - Ergebnisse einer In-vivo-Untersuchung am Tiermodell. *Z.Orthop.Ihre Grenzgeb.* 140.281-5.
- Trudel, G., A. Recklies, and O. Laneuville. 2007. Increased expression of chitinase 3-like protein 1 secondary to joint immobility. *Clin.Orthop.Relat Res.* 456.92-7.
- Valchanou, V. D., and P. Michailov. 1991. High energy shock waves in the treatment of delayed and nonunion of fractures. *Int.Orthop.* 15.181-4.
- Van Arsdalen, K. N., S. Kurzweil, J. Smith, and R. M. Levin. 1991. Effect of lithotripsy on immature rabbit bone and kidney development. *J.Urol.* 146.213-6.
- van der Sluijs, J. A., R. G. Geesink, A. J. van der Linden, S. K. Bulstra, R. Kuyer, and J. Drukker. 1992. The reliability of the Mankin score for osteoarthritis. *J.Orthop.Res.* 10.58-61.
- Vaterlein, N., S. Lussenhop, M. Hahn, G. Delling, and A. L. Meiss. 2000. The effect of extracorporeal shock waves on joint cartilage--an in vivo study in rabbits. *Arch.Orthop.Trauma Surg.* 120.403-6.
- Veje, K., J. L. Hyllested-Winge, and K. Ostergaard. 2003. Topographic and zonal distribution of tenascin in human articular cartilage from femoral heads: normal versus mild and severe osteoarthritis. *Osteoarthritis.Cartilage.* 11.217-27.
- Volck, B., J. S. Johansen, M. Stoltenberg, C. Garbarsch, P. A. Price, M. Ostergaard, K. Ostergaard, P. Lovgreen-Nielsen, S. Sonne-Holm, and I. Lorenzen. 2001. Studies on YKL-40 in knee joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Involvement of YKL-40 in the joint pathology. *Osteoarthritis.Cartilage.* 9.203-14.

- Volck, B., K. Ostergaard, J. S. Johansen, C. Garbarsch, and P. A. Price. 1999. The distribution of YKL-40 in osteoarthritic and normal human articular cartilage. *Scand.J.Rheumatol.* 28.171-9.
- Wang, C. J., F. S. Wang, C. C. Huang, K. D. Yang, L. H. Weng, and H. Y. Huang. 2005. Treatment for osteonecrosis of the femoral head: comparison of extracorporeal shock waves with core decompression and bone-grafting. *J.Bone Joint Surg.Am.* 87.2380-7.
- Wang, F. S., C. J. Wang, H. J. Huang, H. Chung, R. F. Chen, and K. D. Yang. 2001. Physical shock wave mediates membrane hyperpolarization and Ras activation for osteogenesis in human bone marrow stromal cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 287.648-55.
- Wang, F. S., K. D. Yang, R. F. Chen, C. J. Wang, and S. M. Sheen-Chen. 2002. Extracorporeal shock wave promotes growth and differentiation of bone-marrow stromal cells towards osteoprogenitors associated with induction of TGF-beta1. *J.Bone Joint Surg.Br.* 84.457-61.
- Weber, U., M. Nietert, and E. Jacob. 1987. Möglichkeit und Grenzen der Ultraschallbearbeitung - Entfernung von Knochenzementen. *Aktuelle Probl.Chir Orthop.* 31.347-9.
- Weinstein, J. N., D. M. Oster, J. B. Park, S. H. Park, and S. Loening. 1988. The effect of the extracorporeal shock wave lithotripter on the bone-cement interface in dogs. *Clin.Orthop.Relat Res.*261-7.
- West, C. M., R. Lanza, J. Rosenbloom, M. Lowe, H. Holtzer, and N. Avdalovic. 1979. Fibronectin alters the phenotypic properties of cultured chick embryo chondroblasts. *Cell* 17.491-501.
- Wu, W., R. C. Billingham, I. Pidoux, J. Antoniou, D. Zukor, M. Tanzer, and A. R. Poole. 2002. Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13. *Arthritis Rheum.* 46.2087-94.
- Yeaman, L. D., C. P. Jerome, and D. L. McCullough. 1989. Effects of shock waves on the structure and growth of the immature rat epiphysis. *J.Urol.* 141.670-4.
- Zhong, P., Y. Zhou, and S. Zhu. 2001. Dynamics of bubble oscillation in constrained media and mechanisms of vessel rupture in SWL. *Ultrasound Med.Biol.* 27.119-34.

8. Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Markus Maier danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die umfassende Betreuung bei der Durchführung der Arbeit.

Des Weiteren danke ich Dr. Susanne Mayer für die unermüdliche, zuverlässige und konstruktive Betreuung. Sie stand mir nicht nur jederzeit bei allen Fragen zur Verfügung, sondern zeigte mir auch, dass wissenschaftliches Arbeiten Spaß machen kann.

Ganz besonderer Dank gilt vor allem auch Julia Redeker, Birte Sievers und Bärbel Schmitt, die mir sowohl praktisch als auch moralisch eine riesige Hilfe waren.

Meinem Freund Dr. Stephan Lifka danke ich vor allem für die vielen wertvollen praktischen Tipps, natürlich die moralische Unterstützung und das ausdauernde Korrekturlesen meiner Arbeit.

Für Aufmunterung und Motivation danke ich meinen Freunden.

Widmen möchte ich diese Arbeit meinen Eltern, ohne deren Unterstützung weder mein Medizinstudium noch die damit verbundene Möglichkeit zur wissenschaftlichen Arbeit denkbar gewesen wäre.